

# INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Jochen Bogin

aus Germersheim

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2004

Thema

**Identifizierung und Charakterisierung  
von Interaktionspartnern der  
Janus-Kinase Hopscotch in  
*Drosophila melanogaster***

Gutachter: PD Dr. Frank Sauer  
Department of Biochemistry, University of California at Riverside

Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Beyreuther  
Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg

Diese Arbeit wurde erstellt am Zentrum für Molekulare Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und am Department of Biochemistry, University of California at Riverside unter der Leitung von PD Dr. Frank Sauer.

Vorab möchte ich Frank für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Unterstützung während der Durchführung des Projekts danken.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Christian, Simona und Thorsten bedanken, die mich als Vertreter des „alten“ Labors auch bis zum Schluss mit kreativem Rat und moralischer Unterstützung gefüttert haben. Mein Dank gilt ihnen ebenso für die anspruchsvolle Durchsicht des Manuskripts und die daraus resultierenden Anregungen.

Nicht vergessen will ich Dawei, Jaime, Mathias, Tilman und Tobias, die immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben und für lustige BBQs während meines Aufenthalts in Riverside zuständig waren.

Danken möchte ich des weiteren Marie Meister vom CNRS in Strasburg, Frankreich, bei der ich die Techniken der Blutzell- und Lymphdrüsenpräparation lernen durfte und bei Istvan Ando vom SZBK in Szeged, Ungarn, für die Bereitstellung des Blutzell-spezifischen Antikörpers.

Besondere Erwähnung verdient an dieser Stelle meine Frau Heike, die meine Entscheidungen immer respektiert und unterstützt hat, obwohl ich sehr gut weiß, wie überaus schwer ihr dies in manchen Situationen gefallen ist. Auf ihre Unterstützung konnte und kann ich mich in Zukunft stets verlassen. Ich hoffe, auch ein einfaches Dankeschön kann beschreiben, wieviel sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## Zusammenfassung

Signaltransduktionskaskaden ermöglichen es Zellen, auf extrazelluläre Signale mit einer zellulären Antwort zu reagieren. Diese Signalwege sind von fundamentaler Bedeutung für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse. Signaltransduktionskaskaden werden durch die Bindung von kleinen chemischen Molekülen, den Liganden, an membrangebundene oder zytoplasmatische Rezeptoren aktiviert. Diese selektive Bindung von Liganden an Rezeptoren löst zytoplasmatische Enzymkaskaden aus, in deren Verlauf empfangene Signale in Form von posttranslationalen Modifizierungen von Proteinen weitergeleitet und letztendlich auf ein Effektormolekül übertragen werden.

Ein wichtiges Zellkommunikationssystem ist der Jak/Stat-Signaltransduktionsweg, der sich aus Rezeptoren der Cytokin-Rezeptor Familie, Rezeptor-assoziierten Tyrosin-spezifischen Janus-Kinasen (Jaks) und Transkriptionsfaktoren, den „Signal transducers and activators of transcription“ (Stats) zusammensetzt. Jaks nehmen eine zentrale Stellung in diesem System ein: zum einen interagieren sie direkt mit membrangebundenen Rezeptoren, zum anderen interagieren sie mit Stats und regulieren durch Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität dieser Faktoren. Genetische und Zellkultur-Untersuchungen gaben Anlass zur Vermutung, dass Jaks nicht nur mit Stats sondern auch mit anderen Faktoren kommunizieren, um bestimmte zelluläre Prozesse, wie z.B. die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen in *Drosophila melanogaster*, zu steuern. Diese alternativen Zielfaktoren der Jaks waren zu Beginn dieser Arbeit nahezu unbekannt.

Zur Identifizierung bisher unbekannter Interaktionspartner der *Drosophila* Janus-Kinase Hopscotch (Hop) wurde ein „Yeast Two Hybrid Screen“ (YTHS) gewählt. Der YTHS weist Protein-Protein-Interaktionen durch Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors nach und ermöglicht es, Interaktionspartner eines definierten Proteins in Proteinexpressionsbibliotheken zu identifizieren. Mit Hilfe des YTHS konnten im Rahmen dieser Arbeit 21 potentielle neue Interaktionspartner von Hop nachgewiesen werden. Drei dieser Interaktionspartner wurden im Zusammenhang mit Hop weiterführend charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die identifizierte *Drosophila* Cyclin-abhängige Kinase Cdc2 mit Hop sowohl *in vivo* als auch *in vitro* interagiert. Ferner wurde belegt, dass Hop Cdc2 *in vitro* posttranslational durch Phosphorylierung modifizieren kann. Weiterführende *in vivo* Studien der temperatur-sensitiven konstitutiv aktiven *hop*-Mutante *hop<sup>Tum-l</sup>*, die eine Überproliferation und vorzeitige Differenzierung der *Drosophila* Hämocyten bewirkt, haben ergeben, dass *cdc2*-Mutanten diesen Blutzell-Phänotyp supprimieren. In doppelt heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/cdc2*-Mutanten ist die Anzahl der Hämocyten reduziert und die Differenzierung der Lamelloyten kann teilweise unterdrückt werden. Equivalent dazu wird die Hypertropie der *hop<sup>Tum-l</sup>*-mutanten Lymphdrüse, dem hämatopoetischen Organ der *Drosophila* Larve, ebenfalls eingedämmt.

Für die Interaktionspartner CG2944 und CG17033 wurden die Interaktionen mit Hop *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen. CG2944 ist ein Protein der SOCS-Familie, das durch Bindung an Hop die Aktivität der Janus-Kinase inhibieren könnte, wie es für humane SOCS-Proteine bereits gezeigt wurde. CG17033 ist ein Protein der TRAF-Familie. TRAFs sind Komponenten von Tumor-Nekrose-Faktor- oder Toll-Rezeptor Signaltransduktionskaskaden, welche die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, z.B. humanem NFκB und *Drosophila* Dorsal steuern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Zusammenspiel der *Drosophila melanogaster* Janus-Kinase Hop mit dem Zellzyklusregulator Cdc2 die Proliferation und Differenzierung der Hämocyten steuert. Sie zeigen ferner eine funktionelle direkte Regulation des Zellzyklus durch die Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade, wobei erstmals der direkte aktivierende Einfluss von Hop auf eine Komponente des Zellzyklus nachgewiesen wird.

## Summary

Signal transduction pathways are indispensable for developmental and differential processes, allowing cells to react to extra-cellular signals and return a cellular response. Signal transduction cascades are activated through the binding of small molecules, called ligands, to membrane-bound or cytoplasmatic receptors. The selective binding of ligands to receptors triggers cytoplasmatic enzyme cascades. Received signals are transmitted to proteins through post-translational modifications and finally carried to an effector molecule.

An important cell communication system is the Jak/Stat signal transduction pathway. It is composed of a receptor of the Cytokine-receptor family, receptor-associated tyrosine-specific Janus kinases (Jaks) and „Signal transducers and activators of transcription“ (Stats) transcription factors. Jaks play a central role in this system, by directly interacting with membrane-bound receptors. In addition they interact with Stats, regulating the transcriptional activity of Stats by phosphorylation. Genetic investigations and cell culture experiments gave reasons to speculate that Jaks not only communicate with Stats but also with other factors to regulate certain cellular processes such as the proliferation and differentiation of hematopoietic cells in *Drosophila melanogaster*. These alternative target factors of the Jaks were nearly undiscovered at the beginning of this work.

A „Yeast Two Hybrid Screen“ (YTHS) was chosen to identify as yet unknown interaction partners of the *Drosophila* Janus kinase Hopscotch (Hop). The YTHS detects protein-protein interactions via the reconstitution of transcription factors. It offers a powerful tool to explore interaction partners of a defined protein using protein expression libraries. In the course of this work it was possible to detect, with the aid of the YTHS, 21 potential new interaction partners of Hop. Three of these interaction partners were further characterized in connection with Hop.

One of the proteins identified was the *Drosophila* cyclin-dependent kinase Cdc2. It could be shown that Cdc2 interacts with Hop *in vivo* and *in vitro*. Moreover *in vitro* studies proved that Cdc2 can be post-translational phosphorylated by Hop. Using the temperature-sensitive *hop*<sup>Tum-l</sup> mutant, a constitutively active *hop*-mutant that shows an over-proliferation and premature differentiation of the *Drosophila* hemocytes, studies show that *cdc2*-mutants can suppress the blood cell phenotype. In double heterozygous *hop*<sup>Tum-l</sup>/*cdc2*-mutants, the number of hemocytes are reduced and the differentiation of the lamellocytes could partially be suppressed. The hypertrophy of the *hop*<sup>Tum-l</sup>-mutant lymph gland, which is the hematopoietic organ in the *Drosophila* larvae, is equally reduced.

Interactions with Hop *in vivo* and *in vitro* were also shown for the new interaction partners CG2944 and CG17033. CG2944, a member of the family of SOCS-proteins, could inhibit the activity of Jaks through direct binding, as was already proved for human SOCS-proteins. CG17033 is a protein of the TRAF family, which are components of the tumor-necrosis-factor or Toll-receptor signal transduction pathway. These proteins control the activity of transcription factors like human NFκB or *Drosophila* Dorsal.

The results of this work show that an interplay of the *Drosophila melanogaster* Janus kinase Hop with the cell cycle regulator Cdc2 regulates the proliferation and differentiation of hemocytes. Furthermore, Hop was shown to directly influence the activation of a cell cycle component for the first time. Overall, this work shows a functional direct regulation of the cell cycle by the Jak/Stat signal transduction pathway.

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Signaltransduktion</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Der “Tumor Necrosis Factor” (TNF) Signaltransduktionsweg</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Der Jak/Stat-Signaltransduktionsweg</b>	<b>4</b>
1.3.1. Struktur von Janus-Kinasen	5
1.3.2. Janus-Kinasen und deren Funktion in Säugern	7
1.3.3. Die Janus-Kinase Hopscotch und deren Funktion in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.3.4. “Suppressor of cytokine signaling” (SOCS) Proteine regulieren die Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade	11
<b>1.4. Das <i>Drosophila melanogaster</i> Immunsystem</b>	<b>12</b>
1.4.1. Hämatopoese in <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.4.2. Humorale Immunantwort	16
1.4.3. Zelluläre Immunantwort: Die Aufgaben der verschiedenen Blutzelltypen	16
1.4.5. “Leukämie” in <i>Drosophila melanogaster</i>	17
<b>1.5. Der Zellzyklus</b>	<b>19</b>
1.5.1. Regulation der Cyclin/Cdk Komplexe durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung	21
1.5.2. Zusätzliche Cdk-Regulationsmechanismen	23
<b>1.6. Ziele der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>2.1. In vivo Identifizierung von Hop-Interaktionspartnern mittels Yeast-Two-Hybrid-Screen</b>	<b>27</b>
2.1.1. Expressionsnachweis des Gal4BD-Myc-Hop fl Fusionsproteins aus Hefe	30
2.1.2. Funktionelle Charakterisierung des Gal4BD-Myc-Hop fl Fusionsproteins in Hefe	31
2.1.3. Selektion von Hefezellen, die putative Hop-Interaktionspartner exprimieren	33
2.1.4. $\beta$ -Galaktosidasetest der potentiell positiven YTHS-Klone	35
2.1.5. Amplifizierung des <i>Drosophila melanogaster</i> Fusionsgenanteils der Bibliotheksplasmide	36
2.1.6. In silico Recherche zur Charakterisierung der Hop-Interaktionspartner	37
<b>2.2. In vivo Hop-Interaktion mit Cdc2, CG2944 und CG17033 in Hefe</b>	<b>44</b>
2.2.1. Selbstaktivierungstest der Gal4AD-Cdc2-, Gal4AD-CG2944- und Gal4AD-CG17033-Fusionsproteine in Hefe	45
2.2.2. Cdc2, CG2944 und CG17033 interagieren in ihrer Volllängenversion mit Hop in Hefe	47
<b>2.3. In vitro Hop-Interaktion mit Cdc2, CG2944 und CG17033</b>	<b>48</b>
<b>2.4. In vitro Kinase-Assays</b>	<b>50</b>
<b>2.5. In vivo Einfluss der Hop-Cdc2 Interaktion auf die Hämatopoese in <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>55</b>
2.5.1. Cdc2 Mutanten supprimieren den <i>hop</i> <sup>Tum-I</sup> Hämozyten-Phänotyp in vivo - eine quantitative Analyse	56
2.5.2. Cdc2 Mutanten supprimieren den <i>hop</i> <sup>Tum-I</sup> Hämozyten-Phänotyp in vivo - eine qualitative Analyse	64
2.5.3. Cdc2 Mutanten supprimieren den <i>hop</i> <sup>Tum-I</sup> Lymphdrüsen-Phänotyp in vivo	68

---

<b>3. Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>3.1. Funktionelle Hop-Interaktion mit Cdc2</b>	<b>74</b>
3.1.1. Mögliche Phosphorylierungs-Modifizierungen von Cdc2 durch Hop	76
3.1.2. Funktion und Auswirkung der Hop-vermittelten Cdc2-Phosphorylierung auf den Zellzyklus	77
<b>3.2. Funktionelle Hop-Interaktion mit CG2944</b>	<b>83</b>
<b>3.3. Funktionelle Hop-Interaktion mit CG17033</b>	<b>86</b>
<b>3.4. Weitere mögliche funktionelle Hop-Interaktionspartner</b>	<b>89</b>
3.4.1. Adapter-Proteine	90
3.4.2. Proteine der Protein-Biosynthese	90
3.4.3. Proteasen und DNAsen	91
3.4.4. Zelloberflächen-Proteine	92
3.4.5. Proteine des Stoffwechsels / der Atmungskette	92
3.4.6. Unbekannte Proteine	92
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Laborausstattung</b>	<b>93</b>
<b>4.2. Verbrauchsmaterialien</b>	<b>94</b>
<b>4.3. Chemikalien, Enzyme, Proteine, Molekulargewichtsmarker</b>	<b>95</b>
<b>4.4. Antikörper und Affinitätsmatrizen</b>	<b>96</b>
<b>4.5. Radioaktive Substanzen</b>	<b>96</b>
<b>4.6. Bakterienstämme</b>	<b>96</b>
<b>4.7. Hefestamm</b>	<b>96</b>
<b>4.8. Fliegenstämme</b>	<b>97</b>
<b>4.9. DNA</b>	<b>99</b>
4.9.1. Oligonukleotide	99
4.9.1.1. Oligonukleotide für die PCR-Klonierung	99
4.9.1.2. Oligonukleotide für die <i>Site-directed</i> Mutagenese Reaktion von <i>hop</i>	99
4.9.2. Plasmide	100
4.9.2.1. Klonierung	101
4.9.2.2. <i>Sf9</i> -Expressionsplasmide	103
4.9.2.3. Yeast-Two-Hybrid und Hefe-Expression	104
<b>4.10. Medien, Puffer und Stammlösungen</b>	<b>105</b>
4.10.1. Antibiotika	105
4.10.2. Medien und Lösungen zur Hefekultur	105
4.10.3. Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	106
4.10.4. Lösungen für SDS-PAGE	106
4.10.5. Lösungen für Coomassiefärbung von Proteingelen	107
4.10.6. Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen	107
4.10.7. Lösungen für Western Blot	107
4.10.8. Häufig verwendete Stammlösungen / Puffer	108

<b>4.11. Standardmethoden zur Analyse und Manipulation von DNA</b>	<b>109</b>
4.11.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Okayama <i>et al.</i>	109
4.11.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	109
4.11.3. Ethanol Präzipitation	109
4.11.4. Restriktionsverdau von DNA	110
4.11.5. Agarosegelelektrophorese	110
4.11.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	110
4.11.7. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	110
4.11.8. Automatische Sequenzierung von DNA	111
4.11.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	111
4.11.9.1. Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	111
4.11.9.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midi-/Maxiprep)	111
4.11.10. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	112
4.11.11. Ligation von DNA-Fragmenten	112
4.11.12. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	112
4.11.13. Gerichtete Mutagenese von DNA <i>in vitro</i>	113
<b>4.12. Standardmethoden zur Analyse von Proteinen</b>	<b>113</b>
4.12.1. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	113
4.12.2. Silber-Färbung von SDS-Gelen	113
4.12.3. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	114
4.12.4. Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)	114
<b>4.13. Standardmethoden zum “Yeast-Two-Hybrid” System</b>	<b>115</b>
4.13.1. Herstellung selektiver Hefepplatten	115
4.13.2. Transformation kompetenter Hefezellen (rapid one step)	116
4.13.3. Transformation von Plasmidbibliotheken in Hefezellen	116
4.13.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen	117
4.13.5. Filtermethode zum Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase Enzymaktivität	117
4.13.6. Immunpräzipitation von Proteinen aus Hefezellen	118
<b>4.14. Methoden zur Haltung, Kreuzung und Präparation von <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>118</b>
4.14.1. Zubereitung von Fliegenfutter	118
4.14.2. Haltung und Anzucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	119
4.14.3. Sortieren von Fliegen	119
4.14.4. Ansetzen von Kreuzungen	119
4.14.5. Sammeln von Larven des dritten Entwicklungsstadiums	120
4.14.6. Färbung der zirkulierenden Hämocyten von <i>Drosophila melanogaster</i>	120
4.14.7. Qualitative Zählung der zirkulierenden Hämocyten von <i>Drosophila melanogaster</i>	121
4.14.8. Präparation und DAPI Färbung der Lymphdrüsen von <i>Drosophila melanogaster</i>	121
<b>4.15. Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus <i>Sf9</i>-Zellen</b>	<b>122</b>
4.15.1. Amplifizierung und Reamplifizierung rekombinanter Baculoviren	122
4.15.2. Proteinexpression in <i>Sf9</i> -Zellen	123
4.15.3. Reinigung Flag-markierter Proteine aus <i>Sf9</i> -Zellen	123
4.15.4. Reinigung des GST-Flag-markierten Proteins aus <i>Sf9</i> -Zellen	124
4.15.5. Reinigung der NH <sub>2</sub> -terminal-Flag und COOH-terminal-6xHis markierten Proteine aus <i>Sf9</i> -Zellen	125
<b>4.16. <i>In vitro</i> Kinase-Assay</b>	<b>126</b>
<b>4.17. <i>In vitro</i> Protein-Protein Interaktions-Assay</b>	<b>126</b>
<b>5. Abkürzungen</b>	<b>127</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>130</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Signaltransduktion

Die Zellen eines vielzelligen Organismus besitzen hochkomplexe Kommunikationssysteme, sogenannte Signaltransduktionswege, die es ihnen ermöglichen, extrazelluläre Signale zu empfangen und auf diese durch differentielle Expression Signal-spezifischer Gene zu reagieren (Jaenisch und Bird, 2003). Jede Zelle besitzt viele unterschiedlich hochspezialisierte Signalwege, die zum Beispiel die Identität und die Funktion einer Zelle bestimmen, oder an der Anpassung einer Zelle an veränderte Bedingungen beteiligt sind (Richman und Lee, 2003; Cook und Tyers, 2004).

Signalwege basieren auf einem gemeinsamen Konzept. Membrangebundene oder zytoplasmatische Proteine wirken als primäre Rezeptoren von Signalen, sogenannte Liganden. Hierbei handelt es sich um eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle wie zum Beispiel Aminosäuren, Acetylcholin, Peptide oder Proteine (Sherr, 2004). Die Bindung des Liganden an den Primärrezeptor löst eine intrazelluläre Enzymkaskade aus, in deren Verlauf das empfangene Signal durch enzymatische Modifizierung von Proteinen weitergeleitet wird und letztendlich die Aktivität eines Effektorproteins reguliert (Hindley und Kloch, 2002).

Die Primärrezeptoren der Plasmamembran lassen sich im Allgemeinen in vier Klassen einteilen. 1) G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nach Bindung eines Liganden ein G-Protein aktivieren, welches entweder ein Enzym aktiviert oder hemmt, das wiederum die Biosynthese eines „Second-Messenger“ Moleküls katalysiert (Dolphin, 2003; Schiebert und Zsembery, 2003). Als weitere Möglichkeit kann ein Ionenkanal beeinflusst werden, was eine Veränderung des Membranpotentials zur Folge hat. 2) Ionenkanal-Rezeptoren verändern nach Bindung eines Liganden ihre Konformation, wodurch bestimmte Ionen die Membran durchqueren können (Lanzafame *et al.*, 2003). 3) Rezeptoren mit eigenständiger Enzymaktivität können in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden. In einigen Fällen wird nach der Ligandenbindung eine im Bereich der zytoplasmatischen Rezeptordomäne befindliche Gaunylat-Cyclase- oder Proteinphosphatase-Aktivität stimuliert. In den meisten Fällen wird eine Serin/Threonin- oder eine Tyrosin-spezifische Proteinkinase aktiviert (Paul und Lombroso, 2003; Schmitz *et al.*, 2003). Durch Autophosphorylierung entstehen

auf dem Rezeptor Bindungsstellen für verschiedene zytosolische Substrat- bzw. Effektorproteine. 4) Rezeptoren ohne eigene katalytische Aktivität, die jedoch nach Ligandenbindung zytoplasmatische Tyrosin-spezifische Proteinkinasen binden können (Ferrara, 2003). Diese Bindung bewirkt eine Aktivierung der Kinase, die durch Phosphorylierung anderer Effektorproteine das empfangene Signal weiterleitet. Ein Beispiel dieses Signaltransduktionswegs stellt die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade dar (Hou *et al.*, 2002; Dell'Albani *et al.*, 2003).

Bei Effektorproteinen kann es sich um Transkriptionsfaktoren handeln. Transkriptionsfaktoren können nach Aktivierung direkt auf die Genexpression einwirken (Devir *et al.*, 2001). Eine weitere Gruppe der Effektorproteine stellen Komponenten des Zellzyklus dar. Hierbei beeinflussen diese Proteine das Wachstum und die Teilung von Zellen (Surpin und Raikhel, 2004).

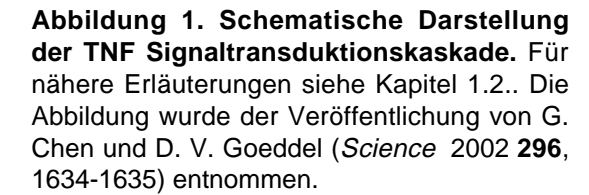
## 1.2. Der Tumor Necrosis Factor (TNF) Signaltransduktionsweg

Der TNF Signaltransduktionsweg ist durch viele Forschungsarbeiten humaner Krankheiten ausführlich untersucht worden. So ist heute bekannt, dass der Ligand TNF ein Homotrimer ist, welches sich aus Untereinheiten zu je 157 Aminosäuren zusammensetzt (Abbildung 1). Dieser Ligand bindet an den TNF-Rezeptor 1 oder 2, welcher wiederum eine intrazelluläre Kaskade auslöst, die hauptsächlich in der Aktivierung zweier Transkriptionsfaktoren, NF- $\kappa$ B und c-Jun, mündet. Es wurde nachgewiesen, dass NF- $\kappa$ B und c-Jun für die induzierbare Genexpression spezifischer Gene der Entwicklung und des Immunsystems verantwortlich sind (Haridas *et al.*, 1999; Locksley *et al.*, 2001; Aggarwal *et al.*, 2002).

Im einzelnen führt die Bindung des Liganden TNF an den TNF-Rezeptor zur Dissoziation des inhibitorisch wirkenden Proteins „Silencer of death domains“ (SODD) von der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Die „frei“ gewordenen Domänen des Rezeptors interagieren untereinander, was ein Erkennungssignal für die Adapterproteine „TNF-receptor associated death domain“ (TRADD), „Receptor interacting protein“ (RIP), „TNF-receptor associated factor“ (TRAF) und „Fas-associated death domain“ (FADD) bildet. Diese Adapterproteine rekrutieren daraufhin spezifische Schlüsselenzyme, welche die Expression Signal-spezifischer Gene veranlassen (Sugarmann *et al.*, 1985; Darnay *et al.*, 1998, 1999). So wird zum Beispiel für das Adapterprotein TRAF2 vermutet, dass es den MAPK Signal-

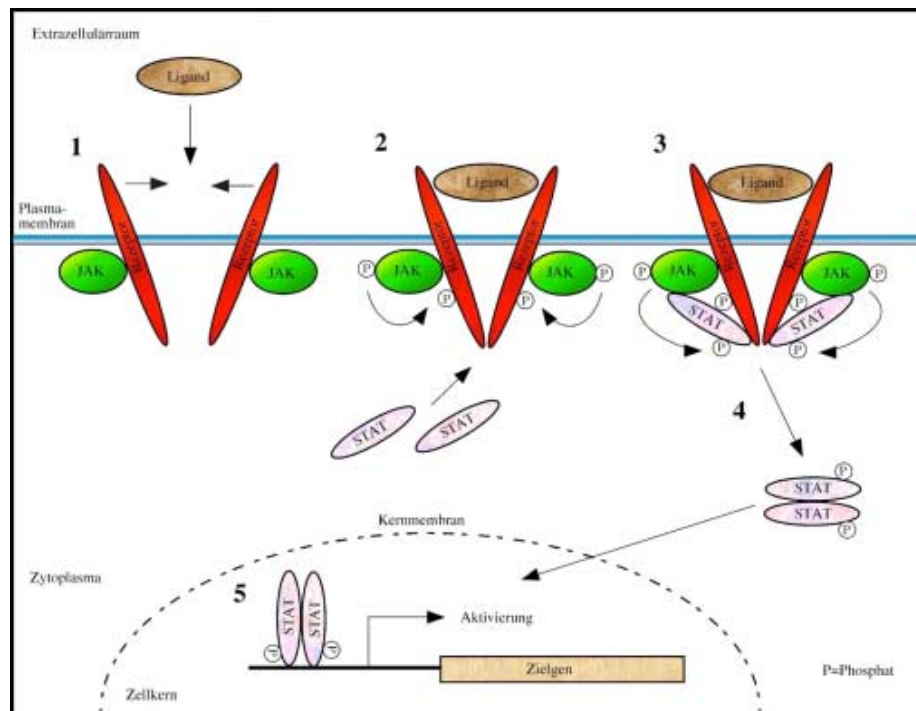
IκB wird durch einen sogenannten IκB Kina-  
se (IKK) Komplex phosphoryliert. Dieser

Obwohl die Komponenten dieser Signaltransduktionskaskade durch viele Studien identifiziert werden konnten, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar, wie die Vernetzung der einzelnen Signaltransduktionskaskaden untereinander funktioniert und welche Komponente eines Signalwegs Komponenten einer anderen Kaskade aktivieren können.



### 1.3. Der Jak/Stat Signaltransduktionsweg

Einer der direktesten Wege, auf denen extrazelluläre Signale in den Zellkern gelangen können, ist die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade (Pellegrini und Dusanter-Fourt, 1997). Die Signaltransduktionskaskade setzt sich im einfachsten Fall aus drei Komponenten zusammen: einem membrangebundenen Zelloberflächenrezeptor der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie, einer Rezeptor-assoziierten Tyrosin-Kinase der Familie der Janus-Kinasen (Jaks) und Stats (Signal transducers and activators of transcription; Ihle und Kerr, 1995) (Abbildung 2). Die Rezeptoren der Cytokine-Superfamilie besitzen keine intrinsische katalytische Aktivität, wodurch sie auf die katalytische Aktivität der assoziierten Jaks angewiesen sind. Ein allgemein akzeptiertes Modell postuliert zu Beginn der Signaltransduktionskaskade die konstitutive Assoziation der Jaks mit der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren, um den Vorgang der extrazellulären Ligandenbindung als intrazelluläres Signal weiterleiten zu können. Aktivierung von Jaks erfolgt innerhalb kürzester Zeit als Reaktion auf die Liganden-induzierte Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten, oder einer Konformationsänderung bereits vorhandener Rezeptor-Dimere (Livnah *et al.*, 1999; Remy *et al.*, 1999). Im darauf folgenden Schritt ermöglicht diese Assoziation es den Jaks, sich gegenseitig zu phosphorylieren, wodurch die Transkinaseaktivität der Jaks aktiviert wird. Aktivierte Jaks phosphorylieren infolge dessen spezifische Tyrosinreste der Rezeptoren. Dadurch wird eine Bindungsplattform für die Effektorproteine geschaffen, die die Bindung der zytoplasmatischen Stats an die Rezeptoren ermöglicht. Die Rezeptor-assoziierten Stats werden von Jaks an einem spezifischen Tyrosinrest phosphoryliert (Greenlund *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1997). Die phosphorylierten Stats dissoziieren von den Rezeptoren, bilden durch die erfolgte Phosphorylierung der spezifischen Tyrosinreste Homo- und Heterodimere und können im Gegensatz zu den Monomeren in den Zellkern transloziert werden. Im Zellkern binden Stats an spezifische cis-regulatorische Regionen ihrer Zielgene und aktivieren deren Genexpression (Ihle und Kerr, 1995; Schindler und Darnell Jr., 1995; Taniguchi, 1995; Ihle, 1996).



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade.** JAK= Janus-Kinase; STAT= Signal transducer and activator of transcription. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.3..

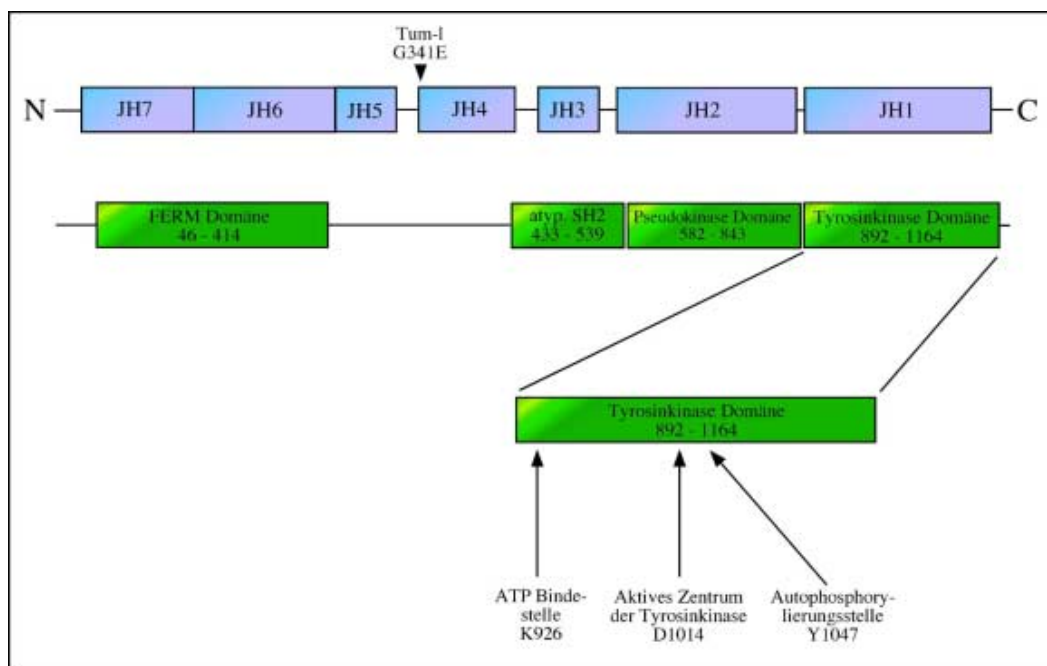
### 1.3.1. Struktur von Janus-Kinasen

Das Genom der Säuger kodiert für vier Proteine der Janus-Kinase Familie, Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 (Duhe und Farrer, 1998). Im Gegensatz dazu wurde in *Drosophila melanogaster* bisher nur eine Janus-Kinase, Hopscotch, nachgewiesen (Binari und Perrimon, 1994). Grob kann die Struktur der Janus-Kinasen in eine aminoternale „Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin“ (FERM) Domäne, einer sich anschließenden atypischen „Src homology 2“ (SH2) Domäne, einer vermutlich katalytisch inaktiven Pseudokinase Domäne und einer carboxyterminalen Kinase Domäne unterteilt werden. Eine weitere Einteilung der Struktur der Janus Kinasen wurde durch die allgemein gebräuchliche Verwendung der Jak-Homologie (JH) Bereiche geschaffen, die durch Übereinstimmung von Sequenzhomologien aller Janus Kinasen in Säugern festgelegt wurden (Abbildung 3).

Die FERM Domäne spielt eine wichtige Rolle in der Assoziation der Jaks mit Rezeptoren und übt vermutlich auch eine regulatorische Funktion auf die katalytische Aktivität der Janus-Kinasen aus (Girault *et al.*, 1999; Hilkens *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Jak Proteine weisen keine eindeutige SH2 Domäne auf, sondern besitzen eine atypische SH2 Domäne (Nars und Vihinen, 2001). Es wird nach dem derzeitigen Stand akzeptiert, dass der JH3 Bereich eine Homologie zu einer atypischen SH2 Domäne besitzt (Abbildung 3). Die

SH2 ähnliche Domäne scheint die Bindung der aminoterminalen FERM Domäne der Jak Proteine an die Rezeptoren der Cytokin-Superfamilie zu unterstützen (Huang *et al.*, 2001). Der Pseudokinase Domäne fallen weitere essentielle regulatorische Funktionen zu. Sie vermittelt die Autoinhibition der basalen Jak Aktivität, was durch Untersuchungen mit Deletionskonstrukten gezeigt werden konnte. Janus Kinasen ohne Pseudokinase-Aktivität besitzen eine deutlich gesteigerte Tyrosin Phosphorylierungsaktivität und führen auch ohne Rezeptoraktivering zur Phosphorylierung und Aktivierung von Stat Proteinen (Saharinen *et al.*, 2000, 2002, 2003).

Die Tyrosin Kinase Domäne beinhaltet als typische Elemente eine ATP-Bindestelle, ein aktives Zentrum und eine Autophosphorylierungsstelle. Eine maximale Stimulation der Kinase Aktivität wird durch Phosphorylierung eines oder mehrerer Tyrosinreste innerhalb der Kinase Domäne vermittelt (Feng *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998). Mutante Jak Proteine, die Phenylalanine anstelle der typischen Tyrosinreste tragen, können nicht durch Stimulation des Jak/Stat Signaltransduktionswegs aktiviert werden (Gauzzi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).



**Abbildung 3. Schematische Darstellung der Janus Kinase Struktur anhand der *Drosophila melanogaster* Janus Kinase Hopscotch.** Die Jak Homologie (JH) Bereiche sind in blau dargestellt und erfolgten durch Strukturübereinstimmungen mit den Janus Kinasen von Säugern. Die Proteindomänen sind in grün laut Angaben der Swiss-Prot Datenbank (<http://au.expasy.org/cgi-bin/get-sprot-entry?Q24592>) dargestellt und spiegeln die Länge der Domänen in Aminosäuren wieder. Tum-I G341E bezeichnet die dominante konstitutiv-aktive Punktmutante *hop<sup>Tum-I</sup>*. Einige wichtige Aminosäuren sind in der vergrößerten Darstellung der Tyrosinkinase Domäne verzeichnet. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.3.1.. Die veränderte Darstellung wurde der Veröffentlichung von Castelli-Gair Hombria und Brown (*Curr. Biol.* 2002 **12**, R569-R575) entnommen.

### 1.3.2. Janus-Kinasen und deren Funktion in Säugern

Die überaus wichtige Bedeutung des Jak/Stat Signaltransduktionswegs wurde durch zahlreiche Geninaktivierungsstudien („Knockouts“) in Mäusen untersucht. Jak Knockout Mäuse zeigen ein breites Spektrum an Phänotypen, die von Defekten in der Blutzellentwicklung bis zur embryonalen Letalität reichen (Tabelle 1).

Jak1 wird in vielen Geweben der Maus exprimiert und ist mit Rezeptoren der Interferon Familie assoziiert. Jak1 Knockout Mutanten weisen massive neuronale Defekte auf und sterben an deren Folgen schon vor der Geburt (Rodig *et al.*, 1998).

Jak2 wird wie Jak1 im überwiegenden Teil der Gewebe der Maus exprimiert. Jak2 mutante Embryonen sterben nach ungefähr 12 Tagen aufgrund einer schweren Anämie. Es konnte in allen beschriebenen Jak2 Knockout Mäusen keine Blutzellbildung beobachtet werden. Jak2 mutante Zellen zeigen keinerlei Reaktion auf Stimulation mit Interleukinen oder Interferonen (Neubauer *et al.*, 1998; Parganas *et al.*, 1998).

Jak3 ist bevorzugt mit dem Cytokin-Rezeptor  $\gamma_c$  assoziiert. Der Knockout von Jak3 und  $\gamma_c$  führt zu den gleichen folgeschweren Immundefekten, die durch das Fehlen von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, aber nicht der B-Lymphozyten, charakterisiert sind (Nosaka *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1995; Thomis *et al.*, 1995; Notarangelo *et al.*, 2001). Des weiteren besitzen Jak3 und  $\gamma_c$  Knockout Mäuse eine kleine Thymusdrüse mit einer annähernd normalen Anzahl von CD4/CD8 Thymozyten, wobei Vorläuferzellen des Thymus fast vollständig fehlen (Russel *et al.*, 1995; Thomis und Berg, 1997; Saijo *et al.*, 1997; Baird *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu diesen meist schwerwiegenden Defekten zeigen Tyk2 Knockout Mäuse nur schwache Phänotypen, welche die Blutzellentwicklung und die Stimulation durch Interferone betreffen (Karaghiosoff *et al.*, 2000; Shimoda *et al.*, 2000).

<b>Jak1</b>	Perinatale Letalität Hemmung der Lymphozytenentwicklung Keine Stimulation durch IL-2, -4, -7, -9, -10, -13, -15 Keine Stimulation durch IFNs Verminderte Stimulation durch IL-6
<b>Jak2</b>	Embryonale Letalität nach ungefähr 12 Tagen Keine Blutzellentwicklung Verminderte Stimulation durch Stammzellenfaktor und CSF-1 Keine Stimulation durch EPO, TPO, IL-3, IL-5 Keine Stimulation durch IFNs
<b>Jak3</b>	Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig mit SCID Phänotyp Hypoplastischer Thymus Periphere T-Zellen sind nach Aktivierung vorhanden, aber funktionslos Keine Weiterentwicklung der B-Zellen aus frühem Entwicklungsstadium Keine Killerzellen und verminderte Anzahl von Lymphknoten vorhanden
<b>Tyk2</b>	Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig Nur gering verminderte Immunantwort auf Stimulation mit IFNs

**Tabelle 1. Phänotypen Janus-Kinase defizitärer Knockout Mäuse.** IL=Interleukin, INF=Interferon, CSF=colony stimulating factor, EPO=erythropoietin, TPO=thrombopoietin, SCID=severe combined immune deficiency. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.3.2..

### 1.3.3. Die Janus-Kinase Hopscotch und deren Funktion in *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* wurde die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade ursprünglich durch ihren Einfluß auf die embryonale Segmentierung identifiziert (Binari und Perrimon, 1994). Die im Laufe der letzten zehn Jahre erforschten vier Hauptkomponenten dieses Signaltransduktionswegs sind neben einigen regulatorischen Faktoren der sekretierte Glykoprotein-Ligand Unpaired (UPD) (Harrison *et al.*, 1998), der Membranrezeptor Domeless/Master of Marelle (DOME/MOM) (Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Castelli-Gair Hombria und Brown, 2002), die Tyrosin-spezifische Janus-Kinase Hopscotch (HOP) (Binari und Perrimon, 1994; Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995, 1997; Girault *et al.*, 1999; O'Shea *et al.*, 2002) und der Transkriptionsfaktor Stat92E/Marelle (Hou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996).

Die *Drosophila* Jak/Stat Signaltransduktionskaskade ist von essentieller Bedeutung innerhalb verschiedener Vorgänge der Entwicklung.



Embryonen, welche Mutationen in den Genen *hop*, *stat92E*, *dome* oder *upd* tragen, zeigen alle ähnliche charakteristische Segmentierungsdefekte (Binari und Perrimon, 1994; Hou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1998 ; Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). An der Etablierung einer Blaupause des metameren Körpermusters der Larve im frühen *Drosophila* Embryo sind eine Reihe von temporär exprimierten Genen (Lücken-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene) beteiligt (Pankratz und Jäckle, 1993). In *upd*-, *hop*- und *stat92E*-defizienten Mutanten wurden Defekte der Expressionsmuster der Paarregel-Gene *even-skipped*, *runt* und *fushi tarazu* und der Segmentpolaritäts-Gene *engrailed* und *wingless* nachgewiesen (Binari und Perrimon, 1994; Hou *et al.*, 1996). So ist z.B. die Expression der *even-skipped* Streifen 3 und 5 in diesen Mutanten signifikant reduziert (Binari und Perrimon, 1994; Hou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996, Harrison *et al.*, 1998).

Hopscotch nimmt eine Zentralstellung bei der Geschlechtsdifferenzierung von *Drosophila* ein. Die Festlegung des Geschlechts wird von dem „Mastergen“ *sex-lethal (sxl)* bestimmt. Die Expression von *sxl* wird durch aktivierende Faktoren des X Chromosoms und durch den hemmenden Faktor des Genprodukts Deadplan reguliert (Cline und Meyer, 1996). Eine höhere Dosis der aktivierenden Faktoren in den weiblichen Embryonen überwiegt diese Hemmung durch Deadplan und steuert somit die Expression von *sxl* (Zeidler und Perrimon, 2000; Zeidler *et al.*, 2000). Als einer dieser aktivierenden Faktoren wurde der Ligand Unpaired der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade identifiziert. Studien von *upd*-defizienten Mutanten bestätigten die Vermutung, dass dieser Signaltransduktionsweg für die Geschlechtsfestlegung mitverantwortlich ist (Jinks *et al.*, 2000; Sefton *et al.*, 2000).

Die Entwicklung der Tracheen wird maßgeblich von der Expression des Gens *trachealess (trh)* bestimmt (Metzger und Krasnow, 1999). Die Bildung des Tracheensystems wurde durch Tracheen-spezifische Marker in *hop*-, *stat92E*- und *dome*-defizienten Mutanten erforscht (Sutherland *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Amorphe *hop*-Mutanten bilden kein Tracheensystem aus und exprimieren *trh* nicht. In paternal geretteten *hop* Embryonen können stellenweise *trh* Transkripte detektiert werden und es kommt zu einer Ausbildung eines defekten Tracheensystems (Chen *et al.*, 2002). Diese Daten lassen vermuten, dass die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade die korrekte Entwicklung der Tracheen durch Regulation der *trh* Expression steuert.

Signale des Jak/Stat Signaltransduktionswegs kontrollieren zusätzlich die Entwicklung verschiedener Zelltypen. Die dominanten temperatur-sensitiven Hopscotch Mutanten Hop<sup>Tum-1</sup> (Tumourus-lethal) und Hop<sup>T42</sup> besitzen eine konstitutiv aktive Kinase und bewirken die Bildung von melanotischen Leukämie-ähnlichen Tumoren und die Hyperproliferation von Blutzellen des Typs Lamellozyten (Corwin und Hanratty, 1976; Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995, 1997; Lanot *et al.*, 2001; Remillieux-Leschelle, *et al.*, 2002; Sorrentino *et al.*, 2002; Meister und Lagueux, 2003). Im Gegensatz zu Hop „gain-of-function“ Mutationen haben Untersuchungen von Hop und Upd „loss-of-function“ Mutationen zur Erforschung der Imaginalzellen des Auges beigetragen. Die Stimulation der Signaltransduktionskaskade und die Aktivität der Tyrosin Kinase wird für die Entwicklung und die Erhaltung der Imaginalzellen des Auges benötigt (Luo *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002). Der vollständige Verlust der *hop* Aktivität führt zur Abwesenheit sich entwickelnder diploider Imaginalzellen in der Larve. Schwächere *hop* Allele lassen die Entwicklung zur adulten Fliege zu, jedoch besitzen diese Fliegen keine, oder nur sehr kleine Augen (Perrimon und Mahowald, 1986; Luo *et al.*, 1999). Ferner bewirkt die Überexpression von *dpas*, einem negativen Regulator von Stat92E, die Ausbildung kleiner und darüber hinaus rauher Augen (Betz *et al.*, 2001). Im Einklang mit diesen Forschungsergebnissen steht die Tatsache, dass die Überexpression von Upd im Auge unter Kontrolle des *glass* Promotors eine dramatische Überproliferation der Photorezeptorzellen bewirkt (Chen *et al.*, 2002). Durch Analyse amorpher *hop* Mutanten konnte überdies gezeigt werden, dass Hop Aktivität für die Etablierung der Äquator- und Ommatidialpolarität des Auges notwendig ist (Luo *et al.*, 1999; Zeidler *et al.*, 1999).

Erst vor kurzem ist die Bedeutung des Jak/Stat Signaltransduktionswegs für die Oogenese und die Spermatogenese entschlüsselt worden. Während der Oogenese entwickeln sich in den frühen Stadien einige spezialisierte Follikelzellen zu sogenannten Stielzellen (stalk cells), die in Kontakt mit Polzellen stehen und das Germarium bilden (Spradling, 1993; Tworoger *et al.*, 1999). Ohne die Signale der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade kommt es zum vollständigen Verlust von Stielzellen und zu einer Ausbreitung der Polzellen (Ghiglione *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2002). Im umgekehrten Fall führt eine ubiquitäre Expression von *upd* in den Ovarien zu einer Ausbreitung der Stielzellen und zwangsläufig

zum Fehlen der Polzellen, woraus auf eine spezifische Funktion von *upd* in den polaren Follikelzellen geschlossen werden kann (Silver und Montell, 2001; McGregor *et al.*, 2002). Neben der Erhaltung und Ausprägung verschiedener Zelltypen der Fortpflanzungszellen ist die Zellwanderung während der Embryonalentwicklung zwingend erforderlich. Die Polzellen, welche an beiden Seiten der Eizelle lokalisiert sind, wandern dabei mit sogenannten Grenzzellen (border cells) (Gupta und Schüpbach, 2001; Lehmann, 2001). Das von Polzellen sekretierte Upd veranlaßt die Wanderung der Grenzzellen, was durch Geninaktivierungsstudien gezeigt werden konnte und die Bedeutung der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade an diesem Prozess hervorhebt (Silver und Montell, 2001; Beccari *et al.*, 2002).

Wichtige Komponenten der Spermatogenese sind zwölf somatischen Stammzellen, welche sich nicht teilen und eine kleine Anzahl somatischer Stammzellen der Keimbahn. Diese somatischen Stammzellen teilen sich asymmetrisch, wobei ein Teil seine Identität als Stammzelle beibehält und sich der zweite Teil zu einem sogenannten Gonialblasten differenziert. Die Gonialblasten behalten auch nach ihrer Ausbildung Kontakt zu den somatischen Stammzellen. Geninaktivierungsstudien von *hop* zeigen, dass die somatischen Stammzellen der Keimbahn und die somatischen Stammzellen nach einigen Teilungen verloren gehen (Kiger *et al.*, 2001). Des weiteren ist die Expression von *upd* zur Ausbildung eines funktionellen Verbandes von Stammzellen der Keimbahn und somatischen Stammzellen unerlässlich (Kiger *et al.*, 2001; Tulina und Matunis, 2001).

Außerdem ist die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade an der Morphogenese des Darms beteiligt, indem sie sowohl die konvergente Ausbreitung als auch die Neuordnung der Darmzellen kontrolliert (Lengyel und Iwaki, 2002).

#### **1.3.4. „Suppressor of cytokine signaling“ (SOCS) Proteine regulieren die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade**

Da die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade in vielen Zelltypen und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien aktiv ist, muss die Aktivität der Jak/Stat Signaltransduktionswege unter verschiedenen Gesichtspunkten streng reguliert sein. Proteine, welche die Aktivität der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade regulieren, wurden erst innerhalb der letzten Jahre entschlüsselt. Eine Gruppe der Regulatoren ist die Familie der SOCS Proteine. SOCS Pro-

teine wirken als negative Regulatoren, die an Janus-Kinasen binden können und deren Aktivität blockieren (Endo *et al.*, 1997; Ohya *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Hilton *et al.*, 1998; Starr und Hilton, 1999). Die Mitglieder der Familie der SOCS Proteine besitzen eine zentrale SH2 Domäne, welche die Assoziation des Regulators an phosphorylierte Janus-Kinasen vermittelt. COOH-terminal zur SH2 Domäne gelegen befindet sich eine SOCS Domäne, die auf noch nicht erforschte Weise die Aktivität von phosphorylierten Janus-Kinasen hemmt. Durch Sequenzhomologievergleiche wird postuliert, dass im Fall von *Drosophila melanogaster* drei Gene für SOCS Proteine kodieren (SOCS16D, SOCS36E und SOCS44A), wobei weitere Proteine eine SOCS Domäne aufweisen (Kile und Alexander, 2001; Larsen und Röpke, 2002; Fujimoto und Naka, 2003; Kubo *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass das *socs36d* Expressionsmuster dem *upd* Expressionsmuster sehr ähnlich ist und durch Hemmung der *upd* Expression die *socs36d* Expression blockiert werden kann. Ebenso stimmen die Phänotypen von *upd* Geninaktivierungsstudien mit mutanten *socs36d* Phänotypen überein (Callus und Mathey-Prevot, 2002; Karsten *et al.*, 2002).

## 1.4. Das *Drosophila melanogaster* Immunsystem

Mehrzellige Organismen können sich gegen infektiöse Organismen durch zwei verschiedene Systeme verteidigen, die man angeborene und erworbene Immunität nennt. Alle Spezies der Insekten können hingegen keine Immunität erwerben, sondern müssen sich lediglich auf ihre angeborene Immunität stützen. Das angeborene Immunsystem der Insekten kann nochmals genauer in eine humorale und eine zelluläre Immunantwort unterteilt werden.

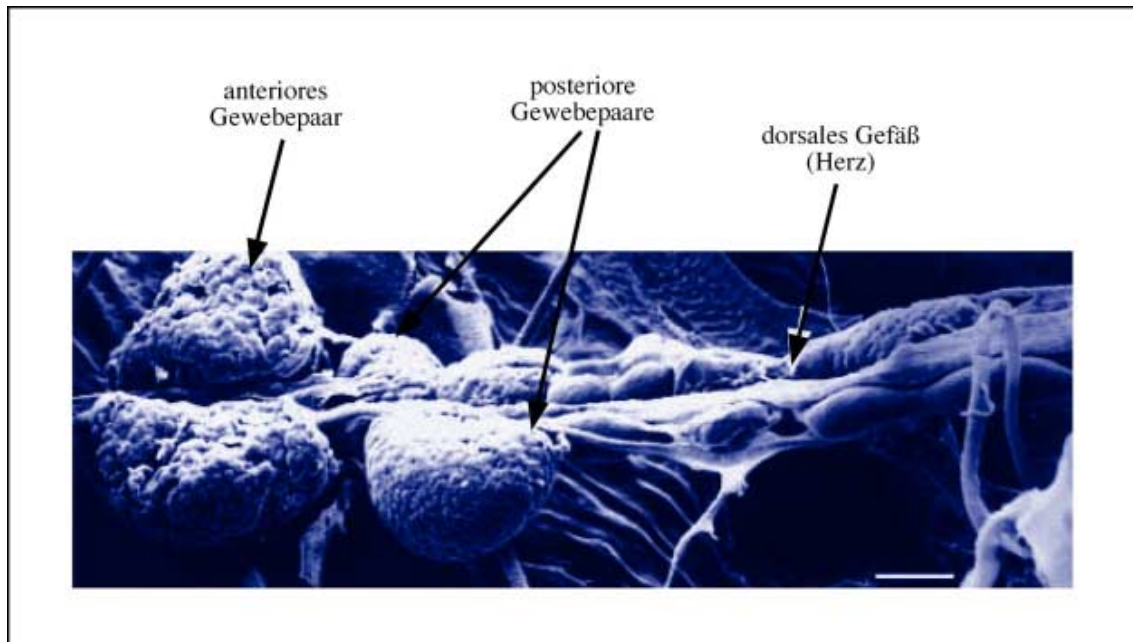
### 1.4.1. Hämatopoese in *Drosophila melanogaster*

Die Hämatopoese in *Drosophila melanogaster* erfolgt in zwei Phasen der Entwicklung und führt zur Bildung von drei unterschiedlichen Hämocyten. Die primäre Bildung der Blutzellen findet in der zweiten Hälfte der Embryogenese statt. Dabei werden die ersten Hämocyten im anterioren Mesoderm gebildet, die sich schnell im gesamten Embryo ausbreiten und für die Phagozytose apoptotischer embryonaler Zellen zuständig sind (Hartenstein und Jan, 1992; Tepass *et al.*, 1994; Franc *et al.*, 1996, 1999). Eine zweite Population von Hämocyten lagert sich im anterioren Bereich des Darms an und differenziert zu den soge-

nannten Kristallzellen, deren Funktion im Embryo allerdings noch nicht geklärt ist (Lebestky *et al.*, 2000).

Gegen Ende der Embryogenese findet die Bildung der Lymphdrüse statt, die das eigentliche hämatopoetische Organ in der Larve darstellt (Shrestha und Gateff, 1982; Rizki und Rizki, 1984; Lanot *et al.*, 2001). Die Vorläuferzellen der Lymphdrüse sind ebenfalls mesodermalen Ursprungs und wandern in dorsaler Richtung, um das erste paarige Gewebe der Lymphdrüse zu bilden (Rugendorff *et al.*, 1994). Im zweiten und dritten Larvenstadium setzt sich die Lymphdrüse meist aus vier bis sechs paarig angeordneten Gewebedrüsen zusammen, die entlang dem dorsalen Gefäße (Herz) aufsitzt (Abbildung 4). Das erste anteriore Gewebepaar ist das größte, wobei die posterioren Paare an Größe abnehmen. In den posterioren Gewebepaaren befinden sich in der Hauptsache undifferenzierte Vorläuferzellen, die als Prohämozyten bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu bestehen die anterioren Gewebepaare hauptsächlich aus voll differenzierten Hämozyten, die in die Hämolymphe abgegeben werden. Die Hämolymphe besteht aus verschiedenen zirkulierenden Zellen, die sich wie folgt zusammensetzen: etwa 95 % Plasmatozyten, welche die Aufgabe der Phagozytose übernehmen, < 5 % Kristallzellen, die kristalline Einschlüsse an Enzymen aufweisen, welche für die humorale Melanisierung benötigt werden und < 0,1 % Lamellozyten, welche zur Einkapselung von Fremdorganismen benötigt werden. Lamellozyten sind in gesunden Tieren in sehr kleinen Mengen vorhanden. Nach einem Parasitenbefall kommt es allerdings zu einer massiven Differenzierung von Lamellozyten, wobei die Anzahl dieses Blutzelltyps in der Hämolymphe stark ansteigt.

Zu Beginn der Metamorphose werden von der Lymphdrüse viele phagozytierende Zellen abgegeben, die eine wichtige Aufgabe bei der Umwandlung des larvalen zum pupalen Gewebe spielen. Bei dieser Umwandlung wird auch die Lymphdrüse selbst abgebaut. Im adulten *Drosophila* gibt es vermutlich kein hämatopoetisches Gewebe mehr (Lanot *et al.*, 2001; Sorrentino *et al.*, 2002). Des weiteren stellen die Blutzellen ihre Teilung am Ende des dritten Larvenstadiums ein, so dass alle Hämozyten der Puppe oder der Fliege von diesen larvalen Zelltypen abstammen.



**Abbildung 4. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Lymphdrüse von *Drosophila melanogaster*.** Die Lymphdrüse besteht aus paarig angeordnetem Lymphgewebe, das dem dorsalen Gefäß aufsitzt. Die anteriore Seite ist links. Der Balken repräsentiert eine Länge von 50 µm. Die Aufnahme wurde der Veröffentlichung von M. Meister und M. Lagueux (*Cell. Microbiol.* 2003 **5**, 573-580) entnommen.

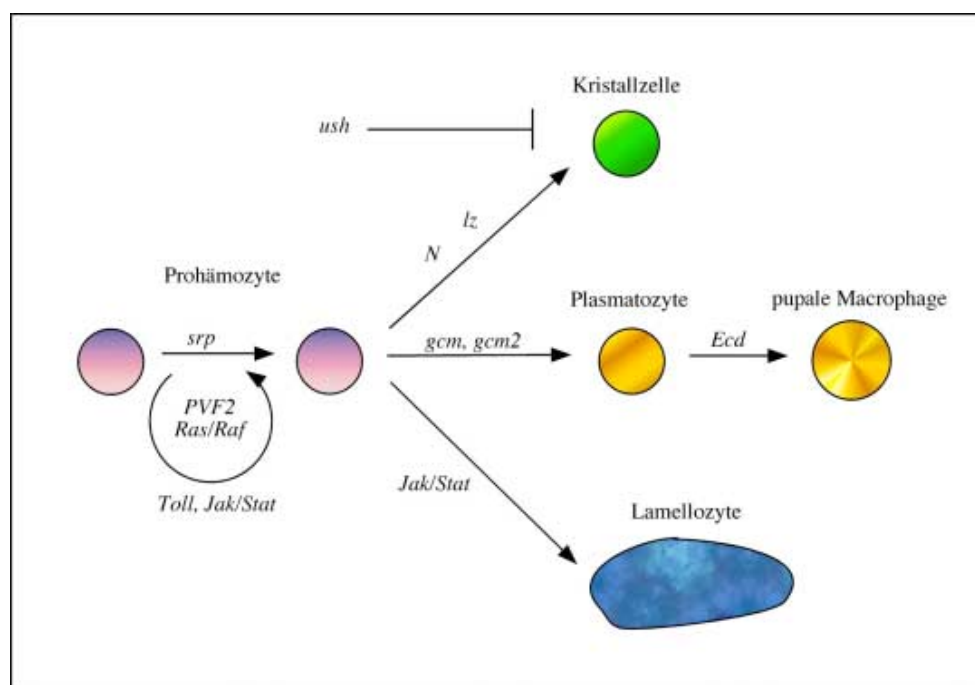
Die *Drosophila* Hämatopoese wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren reguliert, wobei diese zum größten Teil unerforscht sind (Abbildung 5). Die Proliferation der Hämocyten wird zum einen durch das „Platelet Derived Growth Factor Receptor“ (PDGFR) *Drosophila* Homolog „PDGF- and VEGF-receptor related“ (PVR) und dessen Ligand PVF2 vermittelt (Munier *et al.*, 2002). Durch Überexpression des Liganden PVF2 konnte eine 300-fach gesteigerte Proliferationsrate der Prohämocyten nachgewiesen werden. Einen ähnlichen Effekt, etwa 40-fach gesteigerte Proliferationsrate, konnte bei der Überexpression einer aktivierten Form des Ras Proteins nachgewiesen werden, der über den Raf/MAPK Signaltransduktionsweg vermittelt wird (Asha *et al.*, 2003). Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob das PVF2 Signal über den Ras/Raf/MAPK Signaltransduktionsweg weiter geleitet wird. Weiterhin bezieht sich diese Überproliferation durch PVF2 lediglich auf die larvalen Stadien und übt keinen Effekt im Embryo aus (Cho *et al.*, 2002).

Gain-of-function Mutationen der Jak/Stat- und Toll-Signaltransduktionskaskade erhöhen die Anzahl der zirkulierenden Hämocyten (Lemaitre *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995), wohingegen loss-of-function Mutationen des Toll-Signaltransduktionswegs den gegenläufigen Effekt erzielen (Qiu *et al.*, 1998). Die Differenzierung von Prohämocyten zu Hämocyten

wird durch den GATA Transkriptionsfaktor *Serpent* vermittelt (Rehorn *et al.*, 1996; Lebestky *et al.*, 2000; Waltzer *et al.*, 2002).

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die Zink-Finger Transaktivatoren „Glial cells missing“ (*Gcm*, Bernardoni *et al.*, 1997; Lebestky *et al.*, 2000) und *Gcm2* (Alfonso und Jones, 2002) für die Entwicklung der Plasmatozyten erforderlich sind. Dahingegen ist die Entstehung der Kristallzellen in der Larve vom *Serrate/Notch* Signaltransduktionsweg (Duvic *et al.*, 2002; Lebestky *et al.*, 2003) und dem Transkriptionsfaktor *Lozenge* abhängig (Lebestky *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu hemmt das Friend-of-GATA Homolog *U-shaped* die Differenzierung der Kristallzellen (Fossett *et al.*, 2001).

Transkriptionsfaktoren, welche die Entwicklung der Lamellozyten steuern, sind noch unbekannt. Eine gesteigerte Proliferation der Lamellozyten konnte bis jetzt nur in der temperatur-sensitiven, konstitutiv aktiven Janus-Kinase Punktmutante *hop<sup>Tum-l</sup>* der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade und einer *cactus* loss-of-function Mutation des Toll Signaltransduktionswegs nachgewiesen werden (Lemaitre *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des Jak/Stat Signalwegs an der Hämatopoese schließen. Diese Hypothese wird durch die fundamentale Bedeutung der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade an der Hämatopoese in Säugern unterstützt.



**Abbildung 5. Schematische Darstellung der Hämatopoese von *Drosophila melanogaster*.** *Serpent* (*srp*), *U-shaped* (*ush*), *Lozenge* (*lz*), *Glial cells missing* (*gcm*), *Ecdysone* (*Ecd*), *Notch* Signaltransduktionsweg (*N*), *PDGF- und VEGF-related factor 2* (*PVF2*). Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.4.1.. Die veränderte Darstellung wurde der Veröffentlichung von M. Meister und M. Lagueux (*Cell. Microbiol.* 2003 **5**, 573-580) entnommen.

### 1.4.2. Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort beinhaltet die Produktion antimikrobisch wirksamer Peptide (Meister *et al.*, 2000, Lowenberger *et al.*, 2001), reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (Bogdan *et al.*, 2000; Vass und Nappi, 2001) und die komplexe enzymatische Kaskade, welche die Gerinnung oder Melanisierung der Hämolymphe reguliert (Mutta und Iwanaga, 1996; Gillespie *et al.*, 1997).

Sieben verschiedene antimikrobisch wirksame Peptide sind bis zum heutigen Zeitpunkt in *Drosophila* identifiziert worden (Bulet *et al.*, 1999). Sie unterscheiden sich signifikant in ihrer Struktur und weisen meist ein kleineres Molekulargewicht ( $< 5$  kDa) auf. Ihre Wirkungsspektren sind entweder gegen Pilze (Drosomycin, Metchnikowin), gegen Gram-positive (Defensin), oder gegen Gram-negative Bakterien (Attacin, Cecropin, Drosocin, Diptericin) gerichtet (Hoffmann und Reichhart, 1997; Bendelac und Fearon, 2000; Hultmark, 2003; Hoffmann, 2003). Ihre Wirkung besteht z.B. in der Hemmung der Proteinsynthese von Bakterien, die für den Aufbau der äußeren Zellmembran benötigt werden. Die Produktion dieser Peptide wird in den meisten Fällen durch die Präsenz von Mikroorganismen ausgelöst und findet im Fettkörper der Fliege statt (Ekengren und Hultmark, 1999). Schon wenige Stunden nach der Infektion erreichen die antimikrobischen Peptide eine mikromolare Konzentration in der Hämolymphe, wobei die Produktion dieser Peptide hauptsächlich unter Kontrolle zweier Signaltransduktionskaskaden, der Toll und der Imd Signaltransduktionskaskade (Hoffmann und Reichhart, 2002) steht.

### 1.4.3. Zelluläre Immunantwort: Die Aufgaben der verschiedenen Blutzelltypen

Die zelluläre Immunantwort in *Drosophila melanogaster* hat, wie auch in anderen vielzelligen Organismen, die Verteidigungsaufgabe gegen pathogene Mikroorganismen. Kommt es durch Mutationen zum Ausfall einer funktionierenden Immunantwort im Falle einer Infektion, folgt unweigerlich der Tod des Wirtsorganismus (Braun *et al.*, 1998; Elrod-Erickson *et al.*, 2000). Um dies zu verhindern, haben die runden Plasmatozyten die Aufgabe, pathogene Mikroorganismen und apoptotische Zellen zu phagozytieren und diese unschädlich zu machen. Wie dieser Mechanismus im Detail funktioniert, ist bis heute unbekannt, allerdings benötigt die Phagozytose ein funktionierendes Produkt des *croquemort* Gens (Franc *et al.*, 1996, 1999). Es wird des weiteren vermutet, dass Plasmatozyten



ihrerseits Signale zu anderen immunologischen Geweben aussenden, um eine gemeinsame Immunantwort zu erreichen. Ist ein Wirtsorganismus von einem Parasiten befallen, kommt es als Teil der humoralen Immunantwort zur Produktion von antimikrobiischen Peptiden im Fettkörper. In Fliegen, die kein funktionierendes zelluläres Immunsystem haben, konnte nachgewiesen werden, dass diese humorale Immunantwort nach einer Infektion ausbleibt (Basset *et al.*, 2000).

Einkapselung von Pathogenen ist essentiell, wenn z.B. Wespen bestimmter Arten Eier in die Larven von *Drosophila melanogaster* legen. An dieser Reaktion sind sowohl die Kristallzellen, als auch die abgeflachten Lamellozyten beteiligt. Als erstes lagern sich Plasmatozyten an die Eier an und es kommt zur gesteigerten Proliferation von Kristallzellen, die das Enzym Prophenoloxidase exprimieren, (Russo *et al.*, 1996; Sorrentino *et al.*, 2002) und zur Differenzierung von Lamellozyten (Lanot *et al.*, 2001). Die Lamellozyten lagern sich in mehreren Schichten um die Parasiten an und lösen somit die Melanisierungsreaktion aus.

Im Allgemeinen wird die Melanization durch eine Kaskade von Serin Proteasen kontrolliert. Dabei wird durch Spaltung des inaktiven Proteins Prophenoloxidase das aktive Enzym Phenoloxidase hergestellt. Phenoloxidase katalysiert die Oxidation von Phenolen zu Quinonen, die im letzten Schritt der Kaskade zu Melanin polymerisieren. Die beteiligten Elemente dieser Kaskade sind in *Drosophila* noch nicht identifiziert worden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass das Gen *serpin* daran beteiligt ist und die Umwandlung der Prophenoloxidase in Phenoloxidase beeinflusst (De Gregorio *et al.*, 2002; Ligoxygakis *et al.*, 2002).

#### **1.4.4. „Leukämie“ in *Drosophila melanogaster***

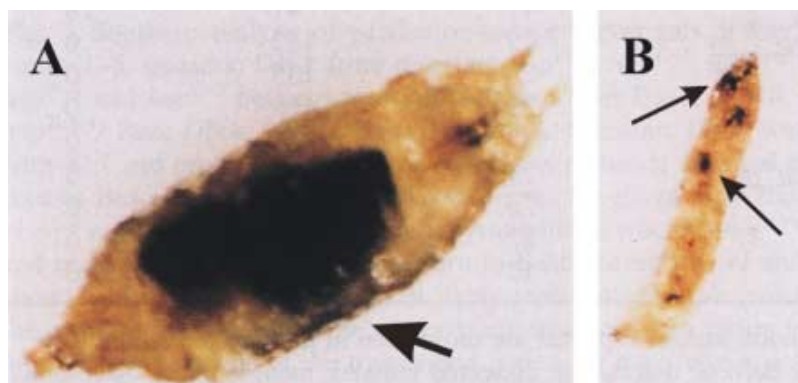
Mutationen der Janus-Kinase Hopscotch bewirken eine Leukämie-ähnliche Hyperproliferationen und Differenzierungen der Blutzellen in *Drosophila melanogaster* (Hanratty und Ryerse, 1981; Luo *et al.*, 1997). Die beiden dominanten, temperatur-sensitiven Mutationen Hop<sup>Tum-1</sup> und Hop<sup>T42</sup> bewirken eine 5- bis 20-fach gesteigerte Proliferationsrate der Plasmatozyten. Bei der restriktiven Temperatur kommt es zusätzlich zu einer frühzeitigen Differenzierung der Lamellozyten. Verfrüht differenzierte Lamellozyten können abnormale Zelloberflächenstrukturen ausbilden, wodurch es zur Zellaggregation und folglich zur Bildung schwarzer melanotischer Massen (Pseudotumor, Abbildung 6) in nicht-hämatopoetischem Gewebe kommt (Perrimon *et al.*, 1995). Transplantationsexperimente von

hyperaktivem *hop<sup>Tum-l</sup>* Lymphdrüsengewebe in Wildtypfliegen zeigten, daß das mutagene Gewebe seine Fähigkeit bewahrt, Hyperproliferation von Plasmatozyten und Bildung melanotischer Pseudotumore zu induzieren (Hanratty und Dearolf, 1993; Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995).

Molekulare Analysen zeigten, daß die Leukämie-ähnliche Hyperproliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen durch *hop<sup>Tum-l</sup>* und *hop<sup>T42</sup>* durch genau einen Aminosäureaustausch in der Janus Kinase verursacht wird. Die *hop<sup>Tum-l</sup>*-Mutation besitzt einen Aminosäureaustausch von Glyzin zu Glutaminsäure an Position 341 (Abbildung 3). Die *hop<sup>T42</sup>*-Mutante besitzt den Austausch von Glutaminsäure zu Lysin an Position 695. Homologievergleiche aller bekannten Mitglieder der Janus-Kinase Familie haben ergeben, daß sowohl Glyzin an Position 341 als auch Glutaminsäure an Position 695 hochkonserviert sind. Diese Mutationen bewirken konstitutiv aktive Jaks, die sowohl sich selbst, als auch ihre Substrate, wie z.B. Stat, hyperphosphorylieren (Hanratty und Dearolf, 1993; Luo *et al.*, 1995; Dearolf, 1997).

Eine Mutation von Stat92E, die dessen Aktivität reduziert, supprimiert teilweise die Tumorbildung in *hop<sup>Tum-l</sup>* und *hop<sup>T42</sup>*-Mutanten, jedoch nicht die Hyperproliferation der Hämocyten (Hou *et al.*, 1996; Perrimon *et al.*, 1997). Dieser Befund läßt vermuten, daß die Hop-abhängige Hyperproliferation der Hämocyten nicht über Stat, sondern über alternative Signaltransduktionswege oder Faktoren erfolgt (Luo *et al.*, 1997).

Derzeit ist ungeklärt, mit welchen Faktoren Hop und andere Jaks kommunizieren, um die Stat-unabhängige Proliferation hämatopoetischer Zellen zu steuern. Ferner ist unbekannt, wie die vermutlich Hop-abhängige Differenzierung der Lamellozyten erfolgt.



**Abbildung 6.** *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutanten nach Ausbildung sogenannter Pseudotumore. (A) Hemizygote *hop<sup>Tum-l</sup>* Puppe; (B) Hemizygote *hop<sup>Tum-l</sup>* Larve des dritten Entwicklungsstadiums. Die Pfeile kennzeichnen die melanotischen Massen. Die veränderte Abbildung wurde der Veröffentlichung von C. Dearolf (*Biochem. et Biophys. Acta.* 1998 **1377**, M13-M23) entnommen.

## 1.5. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein perfekt dirigiertes Zusammenspiel vieler einzelnen Vorgänge, die zur Verdopplung einer Zelle führen. In vielzelligen Organismen wird die Zellproliferation als Antwort auf Differenzierungssignale und Wachstumsparameter der Zelle reguliert und führt entweder zur Zellteilung, oder zur Stagnation des Zellzyklus. Alle diese Mechanismen stellen sicher, dass sich der Organismus z.B. zur richtigen Grösse und die richtige Anzahl an Zellen entwickelt. Zusätzlich zu diesen Kontrollmechanismen kann der Zellzyklus selbst verändert werden, um sich bestimmten Situationen der Entwicklung anpassen zu können. Diese Veränderung kann innerhalb der ersten dreizehn schnellen embryonalen Kernteilungen von *Drosophila melanogaster* beobachtet werden, die ohne Gap-Phasen (G-Phasen) auskommen und direkt nach der Verdopplung der Chromosomen (Synthese-Phase; S-Phase) zur Mitose (Mitose-Phase; M-Phase) übergehen (Vidwans und Su, 2001).

Der Verlauf des Zellzyklus wird durch koordinierte Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks; Cyclin-dependent kinases) und der Expression ihrer zugehörigen regulatorischen Interaktionspartnern, den Cyclinen, bestimmt. Das breite Spektrum der Regulationsmöglichkeiten, um Cdk Aktivität nach Stimulation äußerer Reize zu regulieren, reicht von der Regulation der Cdk Aktivität über posttranslationale Modifizierung der Cdks bis hin zu Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Kaskaden und der Interaktion von Cyclin/Cdk Komplexen mit Inhibitoren oder Aktivatoren.

Die Kinaseaktivität aller Cdks benötigt die Bindung eines Cyclins, das als positive regulatorische Untereinheit wirkt (Solomon *et al.*, 1990). Jede Phase des Zellzyklus wird durch die Expression einer bestimmten Familie der Cycline charakterisiert (Obaya und Sedivy, 2002). Schwankungen der Cyclin Konzentration stellen somit einen ersten regulatorischen Mechanismus dar, wie Cdk Aktivität reguliert wird (Abbildung 7).

Wenn Zellen der Ruhephase zur Teilung angeregt werden, kommt es als erstes zur Expression der Cycline der D-Familie (Matsushime *et al.*, 1991; Won *et al.*, 1992; Sherr, 1995). Es wurde gezeigt, dass die Expression des *cyclinD1* Gens durch Stimulation der Ras-Raf-MAPK Signaltransduktionskaskade ausgelöst wird und mindestens ein Mitglied der D-Cycline aktiv sein muss, um die G<sub>1</sub> Phase zu beenden (Albaneses *et al.*, 1995; Lavoie *et al.*, 1996; Aktas *et al.*, 1997). Cycline der D-Familie bilden Komplexe mit Cdk4 oder

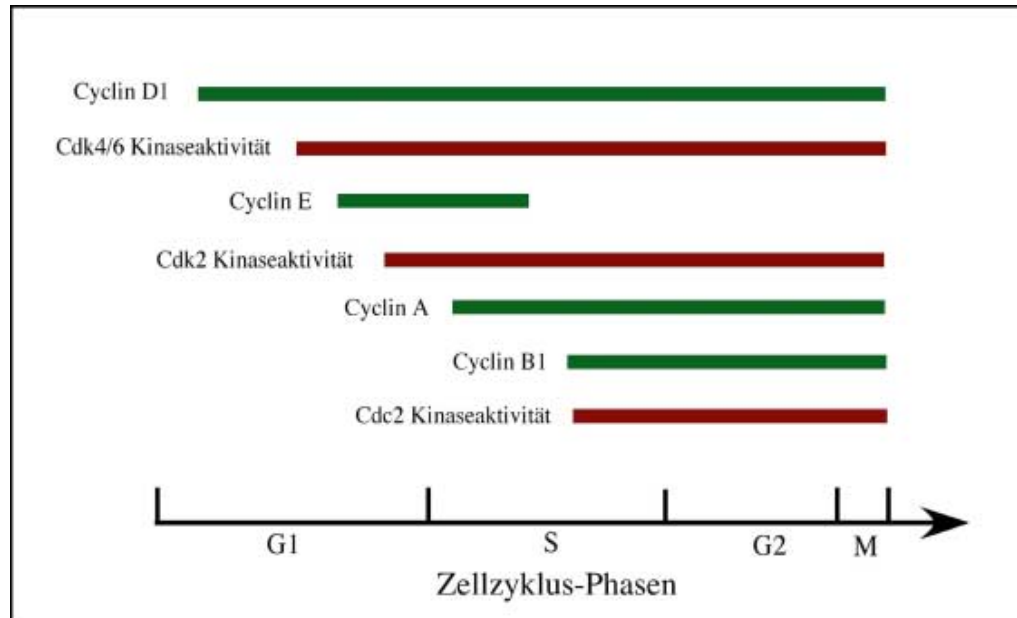
Cdk6, die konstitutiv exprimiert werden und im Vergleich zu CyclinD im Überschuß in der Zelle vorliegen (Bates *et al.*, 1994; Matsushime *et al.*, 1994; Sarcevic *et al.*, 1997). Cycline der E-Familie werden ab Mitte/Ende der G<sub>1</sub> Phase exprimiert (Botz *et al.*, 1996; Geng *et al.*, 1996). CyclinE komplexiert mit Cdk2, dessen Aktivität zum Eintritt in die S-Phase und zur Initiation der DNA Replikation notwendig ist (Dulic *et al.*, 1992; Hinds *et al.*, 1992; Koff *et al.*, 1992; Hatakeyama *et al.*, 1994). Der CyclinE/Cdk2 Komplex phosphoryliert in der S-Phase eine Reihe S-Phase-spezifischer Faktoren, die zur DNA Replikation führen und in ihrem weiteren Verlauf den Eintritt in die G<sub>2</sub>-Phase ermöglichen (Clurman *et al.*, 1996; Won *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000).

Die Expression von Cyclin A erfolgt am Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase. Auch diese Cycline binden Cdk2 und mit niedrigerer Affinität Cdc2 (Pines und Hunter, 1990; Tsai *et al.*, 1991; Elledge *et al.*, 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass auch die Aktivität des Cyclin A/Cdk2 Komplexes für den Übergang in die S-Phase, die DNA Replikation und die Phosphorylierung phasenspezifischer Substrate unerlässlich ist (Cardoso *et al.*, 1993; Heuvel *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1999).

Die Expression des Cyclins B1 erfolgt in der späten S- und der G<sub>2</sub>-Phase. Dieses Protein assoziiert zwar schon in der S-Phase mit seinem Interaktionspartner Cdc2, doch bleibt dieser Komplex bis zum Ende der G<sub>2</sub>-Phase inaktiv, bevor er zum Eintritt in die M-Phase erforderlich ist (Pines und Hunter, 1989; Nurse, 1990; Maller, 1991). Als Substrate des CyclinB1/Cdc2 Komplexes wurden sowohl Strukturproteine, die an der Ausführung der Mitose beteiligt sind, als auch regulatorische Proteine, die die Kontrolle und den zeitlichen Verlauf der Mitose bestimmen, identifiziert. Unter diesen Proteinen befinden sich unter anderem nukleare Lamine, kernspezifische Proteine, Proteine der Kernporen und centrosomale Proteine (Peter *et al.*, 1990; Dessev *et al.*, 1991; Blangy *et al.*, 1995; Keryer *et al.*, 1995; Macaulay *et al.*, 1995; Ookata *et al.*, 1995). Untersuchungen der CyclinB/Cdc2 Substrate haben darüber hinaus ergeben, dass dieser Komplex eine globale Rolle in der Transkriptionsinitiation und der Translation während der Mitose spielt, indem er die TFIIF Untereinheit der RNA Polymerase II und die ribosomale S6 Protein-Kinase phosphoryliert (Long *et al.*, 1998; Papst *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu diesem grundlegenden Aufbau des Zellzyklus durch Cycline und Cdks wurden andere regulatorische Proteine entdeckt, welche ebenfalls zur Regulation beitragen. Unter diesen Faktoren sind zum Beispiel die Polo-ähnlichen-Kinasen und die Aurora-

verwandten Kinasen, die eine überaus wichtige Rolle bei den Ereignissen an den Centromeren spielen ( Glover *et al.*, 1998; Nigg 1998; Bischoff und Plowman, 1999; Giet und Prigent, 1999).



**Abbildung 7. Expressions- und Aktivitätsmuster der Cycline und Cdk's während den Phasen des Zellzyklus.** Die Expression der Cycline ist grün dargestellt. Die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen ist rot illustriert. Die x-Achse der Zellzyklus-Phasen gibt lediglich einen schematischen zeitlichen Verlauf des Zellzyklus an. Für nähere Erläuterungen siehe 1.5..

### 1.5.1. Regulation der Cyclin/Cdk Komplexe durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

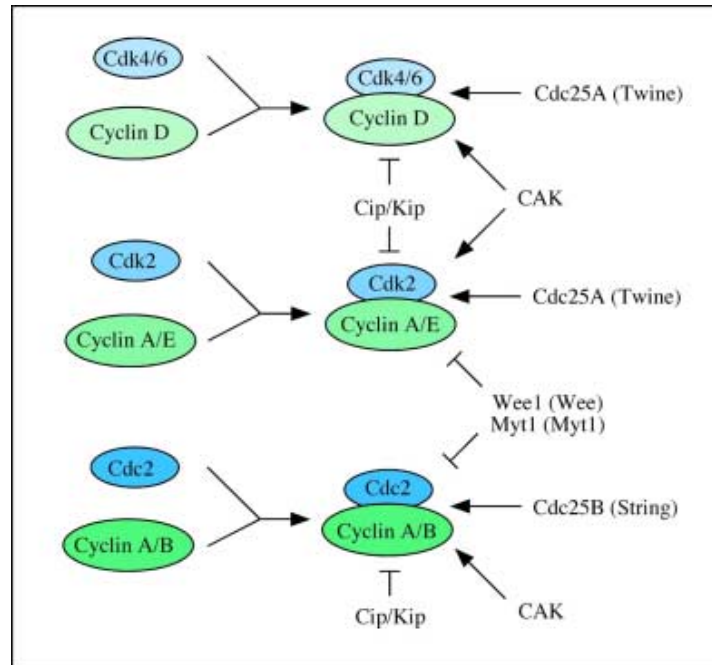
Die Interaktion der Cdk's mit ihren korrespondierenden Cyclinen führt nur zu einem eingeschränkt aktiven Komplex und kann seine vollständige Kinaseaktivität erst entfalten, nachdem konservierte Threoninreste der Cdk's phosphoryliert wurden. Dies ist im Fall von Cdk4/6 Thr172 (Threonin), Cdk2 Thr160, Cdc2 Thr161 und ebenfalls Thr161 in DmCdc2 (*Drosophila melanogaster*) (Gu *et al.*, 1992; Solomon *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994; Hagopain *et al.*, 2001). Die Bindung zwischen einem Cyclin und seiner zugehörigen Cdk scheint die Phosphorylierung der Cdk's zu begünstigen, allerdings wurde ebenfalls die Phosphorylierung von monomerem Cdk2 beobachtet (Fisher und Morgan, 1994; Kato *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994). Wie gezeigt werden konnte, führt die Phosphorylierung an diesem konservierten Threoninrest zu einer Konformationsänderung der Cdk und begünstigt die Bindung von ATP Molekülen. Ausserdem wird vermutet,

dass dadurch die Stabilität des Cyclin/Cdk-Komplexes erhöht wird ( Ducommun *et al.*, 1991; Desai *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996). Die Enzyme, die Cyclin/Cdk Komplexe phosphorylieren und somit aktivieren, oder im umgekehrten Fall dephosphorylieren und somit inhibieren, werden CAK (Cdk-activating kinase) bzw. KAP (kinase-associated phosphatase) genannt (Abbildung 8). CAK und KAP stellen zentrale Proteine der Regulation des Zellzyklus dar. Bis zum jetzigen Zeitpunkt bleibt jedoch unbekannt, wie die Aktivität von CAK und KAP Proteinen reguliert wird (Hannon *et al.*, 1994; Poon und Hunter, 1995; Lee *et al.*, 2000; Yeh, *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001).

Eine weitere Möglichkeit, die Kinaseaktivität der Cdks durch Phosphorylierung negativ zu regulieren, besteht darin, bestimmte Tyrosin- und Threoninreste zu modifizieren. Im Speziellen erfolgt diese Phosphorylierung an Tyr15 von Cdk2, Cdc2 und DmCdc2, an Tyr17 von Cdk4 und Cdk6 und an Thr14 von Cdk2, Cdc2 und DmCdc2. Diese Phosphorylierungen führen zu inaktiven Proteinen und Komplexen, auch wenn im Anschluss daran eine Phosphorylierung durch aktivierenden CAK Proteine erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass Wee1 und Myt1 (*wee* und *myt1* in *Drosophila melanogaster*) diese inhibierenden Phosphorylierungen an Cdks ausführen (Parker und Piwnica-Worms, 1992; McGowan und Russell, 1993; Müller *et al.*, 1995). Obwohl Wee1 und Myt1 bifunktionale Kinasen sind und somit sowohl Threonin- als auch Tyrosinreste modifizieren können, wurde die Präferenz von Wee1 für Tyr15 und von Myt1 für Thr14 nachgewiesen (Kronbluth *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997). Die Aktivität dieser inhibierenden Kinasen wird wiederum durch Phosphorylierung oder durch intrazelluläre Lokalisation in einer Zellzyklus-ähnlichen Weise reguliert (McGowan und Russell, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000).

Da während des Zellzyklus diese inhibierenden Phosphatreste entfernt werden müssen, um die volle Funktionsfähigkeit der Cyclin/Cdk Komplexe zu erreichen, ist die Phosphataseaktivität der Cdc25 Familie von Bedeutung (Honda *et al.*, 1993; Sebastian *et al.*, 1993; Nilsson und Hoffmann, 2000). Interessanterweise sind die Cdc25 Phosphatasen selbst ein Substrat der Cyclin/Cdk Komplexe und erlangen durch diese Phosphorylierung eine gesteigerte Phosphataseaktivität (Hoffmann *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 1994). Den Mitgliedern der Cdc25 Familie konnten verschiedene Aufgaben zugeordnet werden. So ist Cdc25A (*twine* in *Drosophila melanogaster*) vom G<sub>1</sub>/S-Übergang bis zur Mitose aktiv und wird für die Aktivierung von Cyclin A/Cdk2 benötigt (Hoffmann *et al.*, 1994). Cdc25B (*string* in *Drosophila melanogaster*) ist dagegen für die Dephosphorylierung von Cyclin

B1/Cdc2 im Zytoplasma vor dessen Transport in den Zellkern verantwortlich und steuert den Beginn der Mitose durch Aktivierung von Kern-lokalisiertem Cyclin B1/Cdc2 (Norbury *et al.*, 1991; Strausfeld *et al.*, 1994).



**Abbildung 8. Regulation der Cyclin/Cdk Komplexe durch Phosphorylierung, Dephosphorylierung und inhibierende Faktoren.** Die Bezeichnungen der Faktoren sind für Mensch und *Drosophila melanogaster* identisch. Bei unterschiedlicher Namensgebung, werden die *Drosophila* Homologe in Klammer angegeben. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 1.5.1. und 1.5.2.. Die veränderte Abbildung wurde der Veröffentlichung von Obaya und Sedivy (*Cell. Mol. Life Sci.* 2002 **59**, 126-142) entnommen.

### 1.5.2. Zusätzliche Cdk-Regulationsmechanismen

Im Gegensatz zur Cdk-Modifizierung durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung stellt die Bindung eines inhibitorisch wirkenden Proteins an den Cyclin/Cdk Komplex eine effektive Möglichkeit der Regulation dar. Unter einer Reihe von inhibitorisch wirksamen Proteinen befindet sich auch die Familie der Cip/Kip Proteine (Sherr und Roberts, 1995; Sherr und Roberts, 1999) (Abbildung 8). Es wurde nachgewiesen, dass diese Proteine durch eine bevorzugte Bindung an Cyclin/Cdk Komplexe charakterisiert werden können (Harper *et al.*, 1993; Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima und Hunter, 1994). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Vertreter der Cip/Kip Familie die Cdk2 Aktivität hemmt und somit den Übergang des Zellzyklus von der G<sub>1</sub> in die S Phase stoppt (Jiang *et al.*, 1998; McConnell *et al.*, 1999). Durch weitere Untersuchungen wurde postuliert, dass

Cip/Kip für die Formation des Cyclin/Cdk Komplexes notwendig ist (Harper *et al.*, 1995; LaBaer *et al.*, 1997). Dieses Modell sieht einen aktiven Komplex aus Cip/Kip/Cyclin/Cdk vor, wobei die inhibierende Wirkung erst ab einem höheren stöchiometrischen Verhältnis von Cip/Kip eintritt. Im Gegensatz dazu zeigten weiterführende Studien, dass ein Cip/Kip Molekül die Aktivität eines Cyclin A/Cdk2 Komplexes hemmen sollte. Darüber hinaus wird vermutet, dass Cip/Kip Inhibitoren die Aktivierung von Cyclin/Cdk Komplexen durch CAK unterbinden können (Kato *et al.*, 1994; Hengst und Reed, 1998; Adkins und Lumb, 2000; Rank *et al.*, 2000).

Zwei weitere überaus wichtige Regulationsmechanismen des Zellzyklus sollten nicht unerwähnt bleiben. Zum einen erfolgt die spezifische Ubiquitin-abhängige Degradation der Komponenten, die für eine bestimmte Phase nicht benötigt werden. So müssen nach einer Zellteilung bestimmte Parameter erfüllt sein, bevor eine neue Runde der Zellteilung beginnen kann. Der Ubiquitin-vermittelte proteasomale Abbau der Proteine durch den Skp-Cullin-F-box“- (SCF) und den „Anaphase-promoting“-Komplex (APC) stellt dabei die wichtigste Maschinerie dar. Der SCF-Komplex ist vom Ende der G<sub>1</sub>-Phase über die S-Phase bis in die frühe G<sub>2</sub>-Phase aktiv. Der APC-Komplex ist ab Ende der G<sub>2</sub>-Phase und in der M-Phase aktiv. Ohne die Aktivität des APC-Komplexes ist ein Übergang in die M-Phase nicht möglich, da G<sub>2</sub>-Phase-spezifische Faktoren nicht abgebaut werden können (Patton *et al.*, 1998; Peters, 1998; Yu *et al.*, 1998; Page und Hieter, 1999). Als generelle Regel kann man annehmen, dass Cdks konstitutiv exprimiert werden und relativ stabil sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Cycline ihr charakteristisch periodisches Muster der Expression und Degradation (Udvary, 1996).

Der zweite wichtige Regulationsmechanismus besteht in der intrazellulären Lokalisation der Proteine und Komplexe. Da sich alle Cycline und Cdks nach ihrer Synthese im Zytoplasma befinden und dort auch komplexieren, müssen sie zum richtigen Zeitpunkt aktiviert und an den Wirkort im Zellkern gebracht werden. Bereits nachgewiesen werden konnte die aktivierungsabhängige Lokalisation des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes (Hagting *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Cyclin B1 wird in der S-Phase exprimiert und lagert sich an Cdc2 an. Nach den Modifizierungen von Cdc2 durch CAK und Wee1/Myt1 (siehe Kapitel 1.5.1.) wird der Komplex mit Hilfe von Importfaktoren in den Zellkern geschleust (Kong *et al.*, 2000). Das Gleichgewicht der Cdc2 Lokalisation liegt auf der zytosolischen Seite und es wird angenommen, dass erst nach der zusätzlichen Aktivierung durch Cdc25B oder anderer



Faktoren, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind, ein Signal für den Kern-Import und daraus folgend der Übergang der G<sub>2</sub>- in die M-Phase, gebildet wird (Li *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001).

## 1.6. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionspartner der *Drosophila melanogaster* Janus-Kinase Hopscotch zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Dadurch sollte aufgeklärt werden, mit welchen Faktoren/Signaltransduktionskaskaden Janus-Kinasen kommunizieren, um z.B. die Jak-abhängige und Stat-unabhängige Differenzierung und Proliferation hämatopoetischer Zellen auf molekularer Ebene zu steuern.

In dieser Arbeit wurde zur Identifizierung von neuen Hop Interaktionspartnern ein *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsnachweis mittels „Yeast-Two-Hybrid Screen“ verwendet. Die Ergebnisse dieses Screens ließen vermuten, dass Hop mit einer Komponente des Zellzyklus, DmCdc2, interagiert. Dieses Ergebnis führt zur Vermutung, dass Hop durch Phosphorylierung von DmCdc2 die Differenzierung und Proliferation der *Drosophila* Hämocyten reguliert. Diese Vermutung konnte durch verschiedene Experimente *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien und Kinasetests durchgeführt. Rekombinantes Hop bindet und phosphoryliert DmCdc2. Ferner zeigen Gendosisanalysen, dass die Hyperproliferation und Differenzierung von Hämocyten in *hop*<sup>*Tum-l*</sup>-Mutanten durch eine Reduktion der *DmCdc2* Gendosis supprimiert werden kann.

Zusätzlich wurden durch den „Yeast-Two-Hybrid Screen“ nicht charakterisierte Proteine identifiziert, die unter anderem eine SOCS-Domäne oder eine TRAF-Domäne enthalten. Diese Tatsachen und durchgeführte *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien lassen darauf schließen, dass die Regulation der *Drosophila* Jak/Stat Signaltransduktionskaskade ebenfalls durch Bindung eines SOCS-Proteins an Hopscotch reguliert werden kann. Ferner kann angenommen werden, dass die zentrale Kinase Hopscotch der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade ebenfalls mit Komponenten des *Drosophila* TNF-Signaltrans-

duktionswegs kommuniziert, um eine Stat-unabhängige Signal-spezifische Expression Blutzell-spezifischer Zielgene zu erreichen.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Phosphorylierung von Cdc2 durch Hopscotch die Proliferation und Differenzierung der Hämozyten steuert. Dies deutet auf einen neuartigen Mechanismus zur Regulation des Zellzyklus durch Mitglieder der Janus-Kinase Familie hin. Weiterhin wurde die Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten zur Regulation der Aktivität des Jak/Stat Signaltransduktionswegs durch SOCS-Proteine und zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Zusammenspiels der Jak/Stat- und TNF-Signaltransduktionskaskaden zur Regulation der Hämatopoese gelegt.

## 2. Ergebnisse

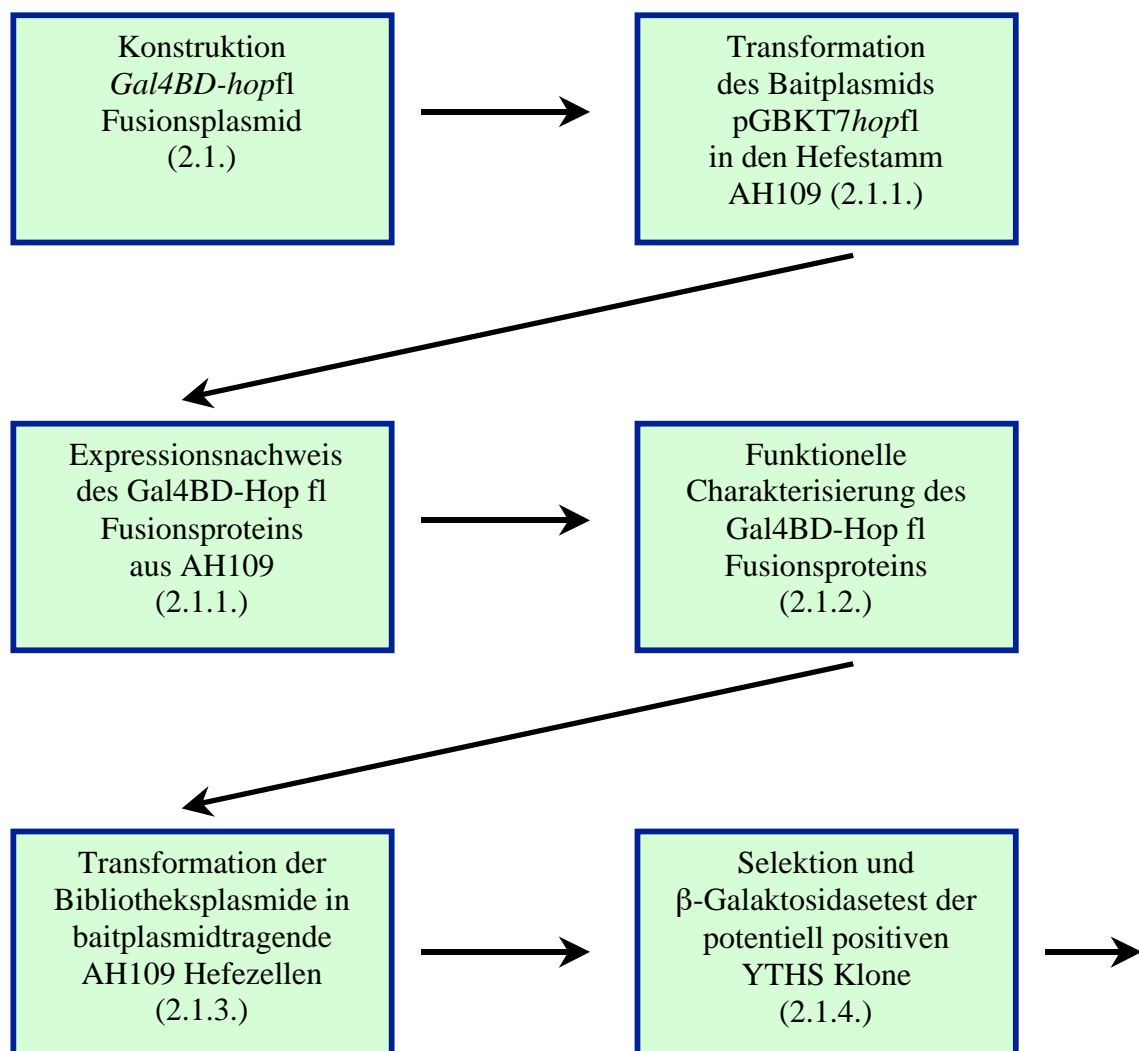
In den letzten zehn Jahren wurde die überaus wichtige Bedeutung der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signaltransduktionsweg für zahlreiche Entwicklungsprozesse in *Drosophila melanogaster* unerlässlich ist (Brown *et al.*, 2001; Beccari *et al.*, 2002; Castelli-Gair Hombria und Brown, 2002). So führt unter anderem die Temperatur-sensitive konstitutiv aktive Mutante *hop*<sup>Tum-l</sup> (Hopscotch tumorous-lethal) zu einer Hyperproliferation der Hämocyten und zu einer vorzeitigen Differenzierung der Lamelloyten. Eine Mutation des Hop-regulierten Transkriptionsaktivators Stat92E wiederum reduziert zwar die Tumorbildung in *hop*<sup>Tum-l</sup> Mutanten, jedoch nicht die Hyperproliferation der Hämocyten und die Differenzierung zu Lamelloyten (Hou *et al.*, 1996; Perrimon *et al.*, 1997). Dieser Befund ließ vermuten, dass die Hop-abhängige Hyperproliferation der Hämocyten und die Differenzierung zu Lamelloyten nicht über Stat, sondern über alternative Signaltransduktionswege oder Faktoren erfolgt (Luo *et al.*, 1997).

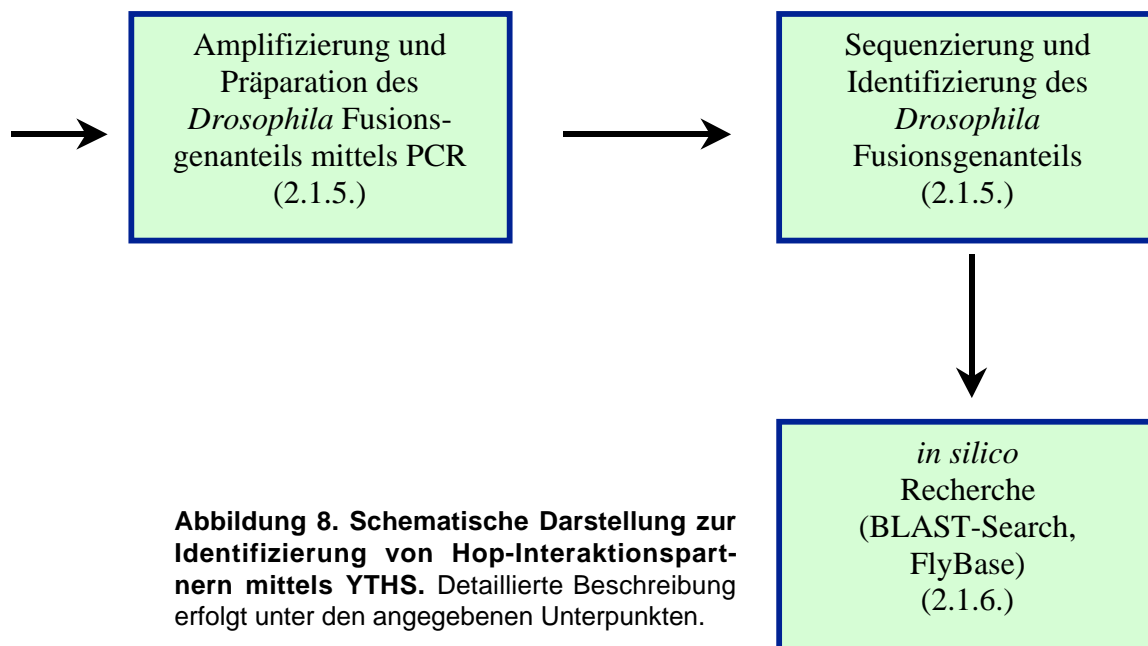
In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese bestärkt und durch weiterführende Untersuchungen identifizierter Hop-Interaktionspartner belegt. Dazu wurde ein *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsnachweis mittels Yeast-Two-Hybrid Screen verwendet. Teile der gewonnenen Ergebnisse wurden durch *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsnachweise und funktionelle Kinase-Assays weiterführend untersucht. Die Bedeutung der funktionellen Interaktion in der Larve wurde anhand von Studien der larvalen Hämocyten und des lymphatischen Gewebes erbracht.

### 2.1. *In vivo* Identifizierung von Hop-Interaktionspartnern mittels Yeast-Two-Hybrid Screen

Das System des Yeast-Two-Hybrid Screens (YTHS) zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* basiert auf der Rekonstitution eines funktionellen Transkriptionsfaktors in Hefe (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Um Hop Interaktionspartner mittels des YTHS zu identifizieren, wurde ein Hefe-Expressionsplasmid (Baitplasmid) konstruiert, das ein Fusionsprotein exprimiert, das sich aus der DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 (Gal4BD; Aminosäuren 1 bis 147; Ma und Ptashne,

1987), einem Myc-Tag und der Volllängensequenz von Hopscotch (Aminosäuren 1 bis 1177) zusammensetzt und nachfolgend als pGBKT7hopfl bezeichnet wird (4.9.2.3.). Dieses Fusionsgen wurde zusammen mit einer embryonalen *Drosophila* cDNA-Expressionsbibliothek in Hefe transformiert. Die embryonale Expressionsbibliothek besteht aus Plasmiden, die *Drosophila* Proteine fusioniert mit der Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4 (Gal4AD) exprimieren (Preyplasmide). Durch die Kotransformation der Plasmide der Expressionsbibliothek mit dem Baitplasmid (4.13.2.) exprimieren die Hefezellen (4.7.) sowohl das Fusionsprotein Gal4BD-Hop fl, als auch eines der Gal4AD Proteine der Expressionsbibliothek. Im Falle einer Interaktion zwischen Hop und einem Fusionsprotein wird die transaktivierende Eigenschaft des Transkriptionsfaktors Gal4 rekonstituiert, was durch die Expression Gal4-abhängiger Reportergene in einem speziell genetisch veränderten Hefestamm nachgewiesen werden kann. Durch weiterführende Analysen kann das Plasmid, welches für den Hop-Interaktionspartner kodiert, isoliert und anhand von Sequenzvergleichen bestimmt werden (Abbildung 8).





Für den in dieser Arbeit durchgeführten YTHS wurde eine Strategie verwendet, die es ermöglicht, die Interaktion von Hop mit Proteinen der embryonalen cDNA-Bibliothek durch das Wachstum transformierter Hefezellen auf Selektionsmedien nachzuweisen. Hierzu wurde der speziell genetisch veränderte Hefestamm AH109 verwendet, der Deletionen in den Genen trägt, die für die Synthese von Adenin und Histidin notwendig sind und somit nicht auf Selektionsmedien ohne Adenin (Ade) oder Histidin (His) wachsen kann. Zusätzlich trägt der Hefestamm die chromosomalen Gal4-abhängigen Reportergene *ade*, *his* und *lacZ*. Hierdurch ist gewährleistet, dass der Hefestamm nur dann auf Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten wachsen kann, wenn durch Protein-Protein-Interaktion ein funktioneller Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird. Zusätzlich kann die Gal4-abhängige Aktivierung der *lacZ*-Expression durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Darüber hinaus besitzt der AH109 Hefestamm Deletionen der *trp*- und *leu*-Gene, um die Transformation dieser Zellen mit dem Bait- und den Preyplasmiden nachweisen und diese Plasmide stabil in der Zelle etablieren zu können. Das Baitplasmid trägt als Marker ein *trp*-Gen, welches für die Synthese von Tryptophan (Trp) essentiell ist. Im Fall der pACT cDNA-Bibliotheksplasmide wurde als Marker ein *leu*-Gen inseriert (Clontech), das für die Synthese von Leucin (Leu) unerlässlich ist. Somit wird gewährleistet, dass nur die Hefe-

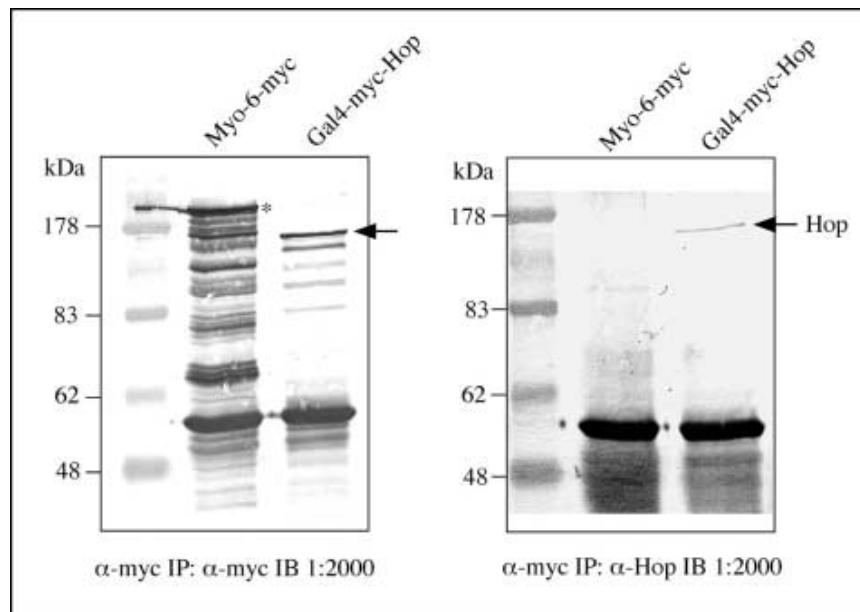
zellen, die beide Plasmide aufgenommen und etabliert haben, auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Selektionsmedien wachsen können.

Im YTHS werden Zellen mit dem Baitplasmid und mit Bibliotheksplasmiden transformiert und die Transformation auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert. Auf diesen Selektionsmedien können nur die Zellen wachsen, die Tryptophan, Leucin, Adenin und Histidin synthetisieren können. Dies ist nur dann möglich, wenn die Hefen zum einen ein Baitplasmid (*trp*<sup>+</sup>) und ein Bibliotheksplasmid (*leu*<sup>+</sup>) tragen und zum anderen einen durch Protein-Protein-Interaktion (im konkreten Fall durch Interaktion von Hop mit einem Protein der Bibliothek) aktiven, rekonstituierten Gal4 Transkriptionsfaktor enthalten, der die Expression der Gal4-abhängigen *his*- und *ade*-Reportergene aktiviert und somit Wachstum auf His<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup> ermöglicht. Kolonien, die auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien wachsen, exprimieren somit Proteine der embryonalen cDNA-Bibliothek, die mit Hop interagieren. Diese Interaktion muss wiederum in einem letzten Test, dem  $\beta$ -Galaktosidase-Filtertest, bestätigt werden, in dem die Aktivierung des dritten chromosomalen Gal4-abhängigen Reportergens *lacZ* geprüft wird.

### 2.1.1. Expressionsnachweis des Gal4BD-Myc-Hop fl Fusionsproteins aus Hefe

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation wurde untersucht, ob das Gal4BD-Myc-Hop fl Fusionsprotein in Hefe exprimiert wird. Die Bestätigung, dass das Fusionsprotein in seiner Volllänge exprimiert wird, verringert dadurch die Anzahl der möglichen falsch positiven Interaktionspartner.

Transformierte Hefezellen, welche unter Kapitel 2.1.2. verwendet wurden, wurden hierzu in Trp<sup>-</sup>-Selektionsflüssigmedium angezogen. Die pelletierten Hefezellen wurden aufgebrochen, die Proteine extrahiert und anschließend eine Immunpräzipitation mittels Agarosegekoppelter anti-myc-Antikörper (Upstate) durchgeführt (4.13.6.). Die immunpräzipitierten Proteine wurden gewaschen, durch SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot Analyse mittels anti-myc und anti-hop Antikörper detektiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9. Expressionsnachweis des Gal4BD-Myc-Hop fl Baitproteins in Hefe mittels Immunpräzipitation (IP).** Als Positivkontrolle wurde ein Hefestamm verwendet, der chromosomal ein *myosin-6-myc* Gen enthält. Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch  $\alpha$ -myc- (links) und  $\alpha$ -Hop-Antikörper (rechts) mittels Western-Blot (IB) Analyse detektiert (Verdünnung der Antikörper 1:2000). Das relative Molekulargewicht der Proteine ist in kDa angegeben. Der Pfeil markiert das Gal4-myc-Hop Protein; der Stern die Myosin-6-myc Positivkontrolle. Für nähere Erläuterungen siehe 2.1.1..

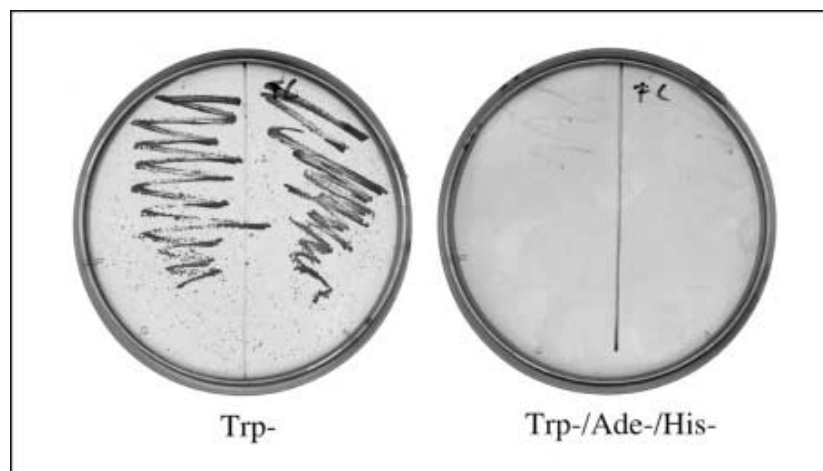
Die Immunpräzipitation des myc-markierten Gal4-Hop fl Fusionsproteins zeigt, dass sowohl bei der Detektion mit einem  $\alpha$ -myc-Antikörper, als auch mit einem  $\alpha$ -hop-Antikörper das Baitprotein Gal4-myc-Hop im YTHS Hefestamm AH109 exprimiert wird (Abbildung 9).

### 2.1.2. Funktionelle Charakterisierung des Gal4BD-Myc-Hop fl Fusionsproteins in Hefe

Um einen aussagefähigen YTHS durchführen zu können, muss gewährleistet sein, dass das Fusionsprotein, welches sich in unserem Fall aus der Gal4BD und Hop zusammensetzt, nicht selbst die Expression der Gal4-abhängigen Reportergene aktiviert. Obwohl die Gal4BD die Genexpression dieser Reportergene nicht aktivieren kann (Ma und Ptashne, 1987), könnte der Hop-Fusionsanteil eventuell eine kryptische Aktivierungsdomäne enthalten. In diesem Fall könnte das Gal4BD-Hop Protein schon in Abwesenheit von Bibliotheksproteinen, welche in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert werden, die Expression der Gal4-abhängigen Reportergene aktivieren und wäre somit nicht für den YTHS verwendbar. Daher wurde im ersten Schritt des YTHS das Gal4BD-Hop fl Fusions-

protein auf eine mögliche „transaktivierende“ Wirkung bezüglich der Gal4-abhängigen chromosomalen Reportergene untersucht.

Das pGBKT7hopfl Baitplasmid wurde in kompetente Hefezellen des YTHS Stamms AH109 transformiert (4.13.2.) und auf Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatten (4.13.1.) ausgestrichen. Von den nach drei Tagen gewachsenen Hefekolonien wurden jeweils 2 Klone auf Trp<sup>-</sup>- und Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausgestrichen, um eine mögliche Aktivierung der chromosomalen Gal4-abhängigen Reportergene *ade* und *his* durch das Baitprotein zu testen.

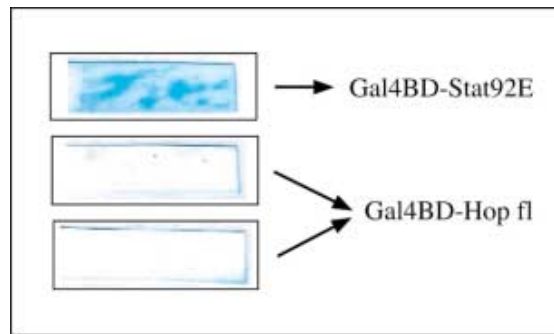


**Abbildung 10. Aktivierungstest der chromosomalen *ade*- und *his*-Reportergene durch das Gal4-Hop fl Fusionsprotein.** Zwei Klon der baitplasmidhaltigen Hefezellen wurden jeweils auf der gleichen Plattenhälfte ausgestrichen. Trp<sup>-</sup>-Selektionsmedien enthalten kein Trp; Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien enthalten kein Trp, Ade und His. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.1.2..

Die getesteten Hefeklone wuchsen auf Trp<sup>-</sup>-Selektionsplatten und tragen somit das Baitplasmid. Im Gegensatz dazu wuchsen die transformierten Hefezellen nicht auf Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien (Abbildung 10). Dies bedeutet, dass das Gal4BD-Hop fl Fusionsprotein die Expression der chromosomalen Gal4-abhängigen *ade*- und *his*-Reportergene nicht aktiviert. Um eine Aktivierung des chromosomalen Gal4-abhängigen *lacZ*-Reportergens durch das Baitprotein ausschließen zu können, wurde mit den oben verwendeten Hefeklonen ein  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest (4.13.5.) durchgeführt.

Die Auswertung dieses  $\beta$ -Galaktosidase Filtertests zeigt keine Aktivierung des chromosomalen Gal4-anhängigen *lacZ*-Reportergens (Abbildung 11). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das Gal4BD-Hop fl Fusionsprotein alleine keines der Gal4-anhängigen Reportergene des AH109 Hefestamms (*ade*, *his* und *lacZ*) aktivieren und somit als „Köder“ in einem aussagefähigen YTHS verwendet werden kann.





**Abbildung 11. Test auf *lacZ*-Reportergen-Aktivität durch das Gal4BD-Hop fl Fusionsprotein mittels  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest.** Dokumentation von Membranen nach  $\beta$ -Galaktosidasetest. Blaufärbung zeigt Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Zwei unabhängige baitplasmidhaltige Hefeklone wurden verwendet. Gal4BD-Stat92E ist ein selbstaktivierender Transkriptionsfaktor, der als Positivkontrolle fungiert. Gal4BD-Stat92E wird von dem Plasmid pGBT9stat92E kodiert. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.1.2..

### 2.1.3. Selektion von Hefezellen, die putative Hop Interaktionspartner exprimieren

Ziel des YTHS ist es, jedes der 15.000 bekannten *Drosophila melanogaster* Proteine auf seine Interaktion mit Hop hin zu untersuchen. Hierzu ist es unerlässlich Transformationsbedingungen zu etablieren, welche sicherstellen, dass jedes Protein mindestens einmal auf seine Interaktion mit Hop hin geprüft wurde. Für den YTHS wurde eine Plasmidbibliothek verwendet, die  $3 \times 10^6$  unabhängige Plasmide enthält. Da der Fusionsanteil der *Drosophila melanogaster* Gene der Bibliotheksplasmide in zufälliger Orientierung und Leseraster an die Gal4BD cDNA fusioniert wurde (durch reverse Transkription mit oligo-dT Primern und anschließendem *XhoI/EcoRI* Verdau; Clontech), müssen bei jeweils zwei möglichen Orientierungen und drei erdenklichen Leserastern mindestens 90.000 unabhängige Bibliotheksplasmide im YTHS eingesetzt werden, um jedes *Drosophila*-Protein zumindest einmal als funktionelles Gal4AD-Fusionsprotein zu exprimieren. Die verwendete Bibliothek enthält  $3 \times 10^6$  unabhängige Plasmide und somit ist jeder der 90.000 unabhängigen Klone theoretisch in ungefähr 30 Kopien in der Bibliothek vertreten. Um zumindest theoretisch sicherzustellen, dass jedes *Drosophila*-Protein auf seine Interaktion mit Hop hin erforscht wird, wurden im durchgeführten YTHS  $5 \times 10^5$  Bibliotheksplasmide eingesetzt.

Mit Hilfe von Testtransformationen wurden zunächst die Bedingungen etabliert, die es ermöglichen, im YTHS  $5 \times 10^5$  Transformanten zu erhalten. Für diese Tests wurden  $10^6$  Zellen mit 0,2  $\mu$ g bis 5  $\mu$ g der Plasmidbibliothek transformiert (4.13.3.)(Tabelle 2) und unverdünnt, bzw. in den Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplat-

tiert, um sowohl das Baitplasmid als auch das Bibliotheksplasmid in der Hefe zu etablieren. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde zur Auswertung die Anzahl der Kolonien auf den Selektionsplatten bestimmt. Die höchste Anzahl an Transformanten wurde mit 1 µg Bibliotheksplasmid bei  $10^6$  eingesetzten Zellen erzielt (Tabelle 2).

Menge der Bibliotheksplasmide in µg	Anzahl der ausplattierten Zellen		
	$10^6$	$10^5$	$10^4$
0,2	Rasen	ca. 17.000	ca. 4.000
0,5	Rasen	ca. 19.000	ca. 5.000
1	Rasen	ca. 21.000	ca. 6.000
2	Rasen	ca. 20.000	ca. 5.500
5	Rasen	ca. 19.000	ca. 4.000

**Tabelle 2. Auswertung der Testtransformation der cDNA-Bibliotheksplasmide in Hefe.** Zur Auswertung wurde die Anzahl der auf selektiven Platten gewachsenen Kolonien bestimmt. „Rasen“ bedeutet unzählbare Anzahl von Kolonien. Für nähere Erläuterungen siehe 2.1.3..

Für den YTHS wurde eine ÜNK der pGBKT7hopfl AH109-Hefekultur in Trp<sup>-</sup>-Selektionsmedium angesetzt, die am Folgetag mit der Plasmidbibliothek transformiert wurde (4.13.3.). Nach der Transformation wurden Verdünnungen von 1:100, 1:1000 und 1:10000 auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert, um die Anzahl der Transformanten auswerten zu können. Die restlichen transformierten Hefezellen wurden auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert (4.13.1.). Die Auswertung der Transformation des Screens auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten erfolgte nach einer Woche. Von  $10^7$  Zellen, die mit 10 µg Plasmidbibliothek transformiert wurden, wuchsen  $10^6$  Transformanten (Tabelle 3). Dieser 11-fache Überschuss der Minimalanzahl von  $9 \times 10^4$  Transformanten gewährleistet, daß jedes *Drosophila*-Protein auf seine Interaktion mit Hop untersucht wurde.

Die Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten wurden für insgesamt zwei Wochen bei 30 °C inkubiert. In der ersten Woche wurden jeden Tag und in der zweiten Woche jeden zweiten Tag neu gewachsene Hefekolonien auf neuen Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausgestrichen. Durch die Selektion auf *his* und *ade* wurde gewährleistet, dass nur die Zellen auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten wachsen, die einen durch Protein-Protein-Interaktion

rekonstituierten Gal4-Transkriptionsfaktor enthalten. Der YTHS ergab nach 2 Wochen 43 positive Klone, die bei erneutem Ausstreichen auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten gewachsen sind (Tabelle 3).

#### 2.1.4. $\beta$ -Galaktosidasetest der potentiell positiven YTHS-Klone

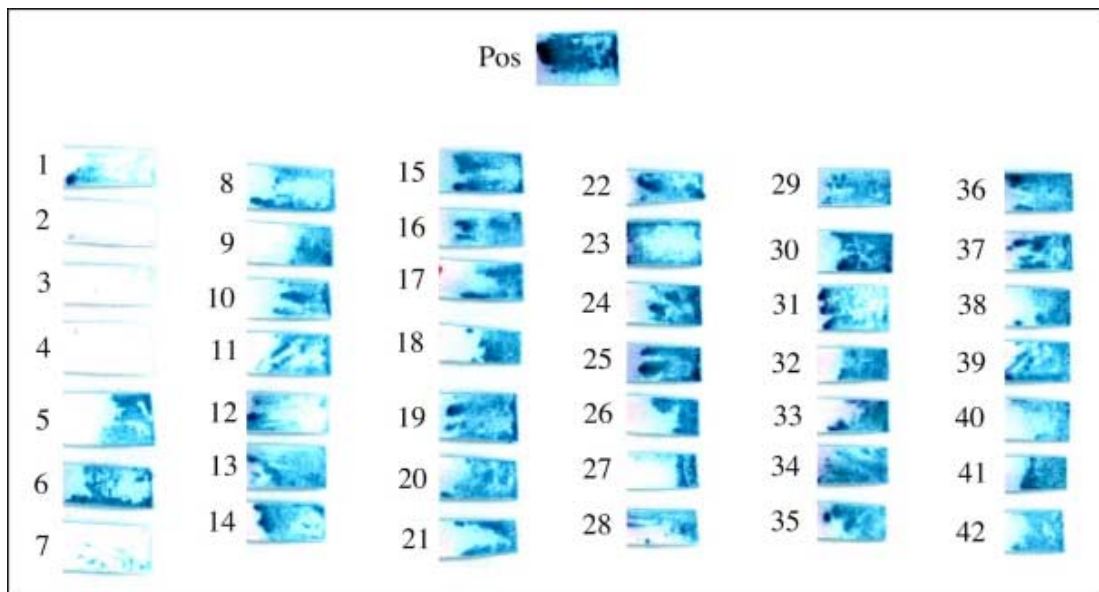
Theoretisch sollte jeder Hefeklon, der auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien gewachsen ist, ein positiver Klon sein, d.h. er enthält ein Fusionsprotein, das mit Gal4BD-Hop fl interagiert und dadurch die Gal4-abhängigen Reportergene aktiviert. Auf den Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten können jedoch auch falsch positive Klone wachsen. Hierzu zählen unter anderem die Klone, die ein Bibliotheksprotein exprimieren, das in der Lage ist, an DNA zu binden und die Expression der Gal4-abhängigen Reportergene zu aktivieren, ohne mit dem Gal4BD-Hop fl Fusionsprotein zu interagieren.

Um die “positiven” YTHS-Klone von den “falsch-positiven” YTHS-Klonen teilweise abgrenzen zu können, wurden die identifizierten potentiell positiven YTHS-Klone auf Aktivierung des Gal4-abhängigen *lacZ*-Reportergens hin getestet. Die Eliminierung von “falsch-positiven” Klonen kann auch hier nicht mit allerletzter Sicherheit festgestellt werden, jedoch reduziert sich die Anzahl der falschen Ergebnisse um einen weiteren Faktor. Hierzu wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase-Filtertest durchgeführt (4.13.5.).

Der Filtertest der potentiell positiven YTHS Klone zeigt bei 38 Klonen eine Blaufärbung und somit Aktivierung des chromosomalen Gal4-abhängigen *lacZ*-Reportergens (Abbildung 12 und Tabelle 3). 4 Klone wuchsen zwar auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien, konnten jedoch nicht das *lacZ*-Reportergen aktivieren. Diese Klone stellen somit “falsch-positive” Klone dar und wurden verworfen.

Anzahl der untersuchten Transformanten	etwa 10 <sup>6</sup>
Anzahl der potentiell positiven YTHS-Klone (auf Trp <sup>-</sup> /Leu <sup>-</sup> /Ade <sup>-</sup> /His <sup>-</sup> -Selektionsmedien gewachsen)	42
Anzahl positiver YTHS-Klone im $\beta$ -Galaktosidase-Filtertest	38
Anzahl <i>in silico</i> identifizierter <i>Drosophila</i> Gene	21

**Tabelle 3. Zusammenfassung des YTHS**



**Abbildung 12. Test auf *lacZ*-Reportergen-Aktivität durch die potentiell positiven YTHS Klone.** Dokumentation von Membranen nach  $\beta$ -Galaktosidasetest. Blaufärbung zeigt Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Klone 2, 3, 4 und 7 zeigen keine deutliche Farbentwicklung und wurden als „falsch-positive“ Klone verworfen. Pos. = Gal4BD-Stat92E selbst aktivierender Transkriptionsfaktor, welcher als Positivkontrolle fungiert. Gal4BD-Stat92E wird von dem Plasmid pGBT9stat92E kodiert. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.1.4..

### 2.1.5. Amplifizierung des *Drosophila melanogaster* Fusionsgenanteils der Bibliotheksplasmide

Im durchgeführten YTHS konnten insgesamt 38 positive Klone identifiziert werden, die potentielle Interaktionspartner der Janus-Kinase Hop exprimieren. Zur Identifizierung des *Drosophila*-Fusionsgenanteils der Bibliotheksplasmide und somit der potentiellen Hop-Interaktionspartner, wurden die Bibliotheksplasmide der positiven YTHS-Klone aus der Hefe isoliert (4.13.4.). Danach wurden die gereinigten Plasmide zur Amplifizierung und Selektion in elektrokompente XL1-blue Bakterien transformiert (4.11.12.) und auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Bibliotheksplasmide wurden nach diesem Amplifizierungsschritt wieder aus den Bakterien isoliert (4.11.9.1.). Die somit in einer größeren Menge gewonnenen und selektionierten Plasmide wurden zur Bestimmung des *Drosophila*-Anteils der Fusionsgene mit Hilfe spezifischer DNA-Primer sequenziert (Firma TopLab).

### 2.1.6. *In silico* Recherche zur Charakterisierung der Hop-Interaktionspartner

Zur Identifizierung der Sequenzen der Hop-Interaktionspartner wurden Datenbankvergleiche (BLAST Search) durchgeführt. Zum einen wurden Vergleiche auf Nukleotidebene durchgeführt, zum anderen wurden die Nukleotidsequenzen mit Hilfe des Computerprogramms Lasergene (DNASar) in die Proteinsequenz übersetzt und Datenbankvergleiche auf Proteinebene durchgeführt. Die Datenbankvergleiche wurden mit WU-BLAST Search von TIGR *Drosophila gene index* (TIGR Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org/tbd/dgi>) durchgeführt.

Sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene zeigen 26 der Datenvergleiche eine Identität zu *Drosophila melanogaster* Genen zwischen 92% und 100%. 12 Sequenzen der amplifizierten Bibliotheksplasmide konnten nicht bzw. nicht eindeutig zugeordnet werden, da es sich hierbei lediglich um Sequenzmotive handelt, die nicht bekannt, oder in vielen Proteinen vertreten sind (Tabelle 4). Diese Gene wurden für die weiteren Untersuchungen nicht in Betracht gezogen.

Anschließend wurden die Datenbankeinträge (FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu>) der identifizierten Proteine ausgewertet (Tabelle 5). Die Auswertung der molekularen Funktion, die Beteiligung an biologischen Prozessen, Proteindomänen und Expressionsmuster gaben erste Hinweise auf die funktionelle Interaktion mit Hop.

YTHS Klon Nr.	TIGR Nukleotid höchste Identität	Identität in %	TIGR Protein höchste Identität	Identität in %
1	CG12262	98	CG12262	97
5	CG4122 ( <i>svr</i> )	99	CG4122 ( <i>svr</i> )	99
6	CG2944 ( <i>gus</i> )	100	CG2944 ( <i>gus</i> )	100
8	CG12079	99	CG12079	96
9	CG9083	100	CG9083	100
10	CG9187	93	CG9187	93
13	CG9184	100	CG9184	100

14	CG9184	100	CG9184	100
17	CG3016	100	CG3016	100
19	CG2198	100	CG2198	100
	( <i>ama</i> )		( <i>ama</i> )	
20	CG7433	97	CG7433	98
21	<i>cdc2</i>	100	<i>cdc2</i>	100
22	CG2944	100	CG2944	100
	( <i>gus</i> )		( <i>gus</i> )	
25	CG12261	99	CG12261	100
	( <i>mRpS22</i> )		( <i>mRpS22</i> )	
26	CG11963	100	CG11963	100
27	<i>cdc2</i>	100	<i>cdc2</i>	100
28	CG9184	100	CG9184	100
31	CG11486	98	CG11486	96
32	CG4849	96	CG4849	96
33	CG5468	92	CG5468	94
35	CG17032	100	CG17032	100
36	CG2944	100	CG2944	100
	( <i>gus</i> )		( <i>gus</i> )	
37	CG11763	98	CG11763	98
40	CG2944	100	CG2944	100
	( <i>gus</i> )		( <i>gus</i> )	
41	CG6058	100	CG6058	100
42	CG8648	100	CG8648	100
	( <i>fen1</i> )		( <i>fen1</i> )	

**Tabelle 4. Zusammenfassung der Gene mit der höchsten Sequenzidentität zu den identifizierten YTHS-Klonen auf Nukleotid- und Proteinebene.** Die Nummerierung der YTHS-Klone entspricht der Reihenfolge der identifizierten Kolonien. Sequenzvergleiche wurden auf Nukleotid- und Proteinebene durchgeführt. Es wurde jeweils das Gen mit der höchsten Identität aufgeführt. Gene die nicht, bzw. nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt. Mit CG gekennzeichneten Gene sind zum größten Teil nicht charakterisiert und wurden durch das *Drosophila*-Genomprojekt von Celera Genomic identifiziert. Für nähere Erläuterungen siehe 2.1.6..

<b><i>cdc2</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	297 AS 34,44 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Protein Serin-Threonin Kinase; Cyclin-anhängige Protein Kinase	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	31D11
<b>Biologischer Prozess</b>	G2/M Übergang des mitotischen Zellzyklus	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	ubiquitär
<b>Proteindomänen</b>	Serin-Threonin Protein Kinase; Protein Kinase-ähnliche Domäne	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	2x

<b><i>CG2944 (gus)</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	350 AS 39,93 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	41E6
<b>Biologischer Prozess</b>	Anteriore-posteriore Achsenfestlegung in den Oozyten	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	SOCS Domäne; C-Terminus Stat-Inhibitoren	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	3x

<b><i>CG9184</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	242 AS 26,15 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	61F6
<b>Biologischer Prozess</b>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	C-terminale Mollusken Rhodopsin Domäne	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	3x

<b><i>CG12262</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	419 AS 45,87 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Acetyl-CoA Dehydrogenase Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	66A10
<b>Biologischer Prozess</b>	Fettsäuren $\beta$ -Oxidation	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Acetyl-CoA Dehydrogenase	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG4122 (svr)</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	1406 AS 158,78 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Metallo-carboxypeptidase D Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	1B5--7
<b>Biologischer Prozess</b>	Kutikula Biosynthese	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Zink Carboxypeptidase; Metalloprotease (M14) Familie	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG12002 (Pxn)</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	1536 AS 169,34 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Peroxidase Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	62E7
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	Embryonale Hämocyten; larvaler Fettkörper
<b>Proteindomänen</b>	Myeloperoxidase; Cyclooxygenase katalytische Aktivität; MHC Klasse 2 Domäne	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG12079</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	265 AS 29,97 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) Aktivität;	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	63B7
<b>Biologischer Prozess</b>	Mitochondrialer Elektronentransport	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	NADH Dehydrogenase 30 Kd Untereinheit der Atmungskette	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG9083</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	342 AS 31,76 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	60E5
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	k. A.	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x



<b><i>CG9187</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	202 AS 23,30 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	61F4
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	k. A.	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG2198 (Ama)</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	333 AS 36,38 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Antigen Bindung	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	84A5
<b>Biologischer Prozess</b>	Zelladhäsion	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	Mesoderm, Neuronen, Hypophyse
<b>Proteindomänen</b>	Immunglobulin und MHC Komplex; Immunglobulin Typ C2	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG3016</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	558 AS 60,88 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Ubiquitin-spezifische Protease Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	5C5--6
<b>Biologischer Prozess</b>	Protein Deubiquitinierung	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	C-terminale Ubiquitin Hydrolase Familie 2	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG7433</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	486 AS 54,53 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	4-Aminobutyrat Transaminase Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	76D8
<b>Biologischer Prozess</b>	Aminosäure Stoffwechsel	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Aminotransferase Klasse III Pyridoxal-Phosphat; PLP-abhängige Transferase	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG12261 (mRpS22)</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	393 As 45,78 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Ribosomales Strukturprotein	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	98B6
<b>Biologischer Prozess</b>	Protein Biosynthese	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	k. A.	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG11963</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	503 AS 54,91 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Succinat-CoA Ligase Aktivität;	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	85B7
<b>Biologischer Prozess</b>	Zitronensäure-Zyklus	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	ATP-Citrat-Lyase; Succinyl-CoA Ligase; Glutathion Synthetase ATP-Binde-ähnliche Domäne	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG11486</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	434 AS 50,18 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	63A6--B1
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Protein-Kinase-ähnliche Domäne	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b><i>CG4849</i></b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	975 AS 110,65 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Translations-Elongations-Faktor Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	98B6
<b>Biologischer Prozess</b>	mRNA Splicing	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Elongationsfaktor G; GTP-Bindung; P-Loop Nukleotid Triphosphat Hydrolase	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b>CG17032</b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	312 AS 30,92 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	k. A.	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	72C1
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	k. A.	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b>CG11763</b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	598 AS 66,42 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Ran Protein Bindung	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	47A7
<b>Biologischer Prozess</b>	k. A.	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	k. A.	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b>CG6058</b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	360 AS 38,91 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Fructose-Biphosphat Aldolase Aktivität	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	97A6
<b>Biologischer Prozess</b>	Glykolyse	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	Fructose-Biphosphat Aldolase Klasse I	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

<b>CG8648 (<i>Fen1</i>)</b>		<b>Proteingröße / Proteinmasse</b>	385 AS 42,95 kDa
<b>Molekulare Funktion</b>	Endonuklease Aktivität;	<b>Chromosomale Lokalisierung</b>	53D14
<b>Biologischer Prozess</b>	DNA Reparatur	<b>Expressionsmuster / Gewebe</b>	k. A.
<b>Proteindomänen</b>	5'3'-Exonuklease N- und I-Domänen, Helix-Hairpin-Helix DNA-Bindemotiv Klasse I und II	<b>Anzahl Interaktionen im Screen</b>	1x

**Tabelle 5. Datenbankangaben wichtiger Informationen über die identifizierten Hop-Interaktionspartner.** Die Angaben entsprechen den aktuellen (Stand 15.01.04) Angaben der FlyBase Datenbank (<http://flybase.bio.indiana.edu>). Alle Angaben beziehen sich auf den gegenwärtigen Forschungsstand. k.A. = keine Angaben in der Datenbank verzeichnet.

Unter den identifizierten Hop-Interaktionspartnern findet sich eine hohe Anzahl von Proteinen, die im Stoffwechsel, oder bei der Energiegewinnung in den Mitochondrien tätig sein könnten. Diese Proteine stellen keine interessanten Interaktionspartner dar, da im Fall der mitochondrialen Proteine eine Interaktion praktisch ausgeschlossen ist. Da die meisten Kandidaten nicht charakterisiert sind und keine bekannten Proteindomänen aufweisen, um eine Zuordnung ihrer Funktion zu ermöglichen, wurden diese Proteine für nähere Charakterisierungen nicht verwendet.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die Proteine Cdc2, CG2944, CG9184 und CG17033 (Kandidat aus einem erst YTHS; J. Bogin Diplomarbeit 2000) verwendet. Die Gene wurden mittels PCR aus einer embryonalen cDNA Bibliothek amplifiziert. CG9184 konnte nicht aus Bibliotheken verschiedener Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* amplifiziert werden. Da dieses Protein durch drei unabhängige Klone im YTHS identifiziert wurde, stellt es einen äußerst interessanten Kandidaten dar. Diese Grundlage kann durch spätere Forschungsarbeiten zur Aufklärung der Stat-unabhängigen und Jak-abhängigen Signaltransduktion genutzt werden.

## **2.2. *In vivo* Hop-Interaktion mit Cdc2, CG2944 und CG17033 in Hefe**

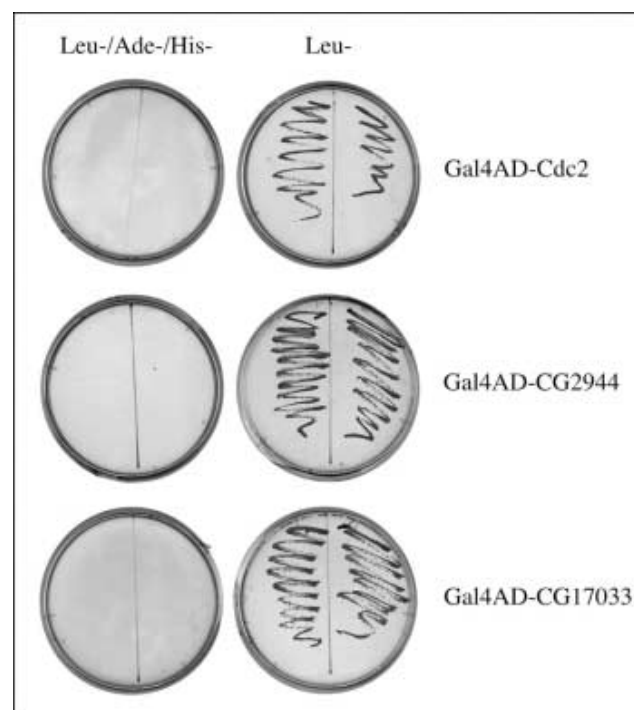
Durch die Verwendung einer *Drosophila melanogaster* cDNA-Plasmidbibliothek, die nach Größe selektionierte cDNA Fragmente enthält, untersucht man in den allermeisten Fällen nur eine Interaktion zwischen dem Bait-Protein und einer verkürzten Form des Interaktionspartners. Dadurch können falsch gefaltete oder verkürzte Interaktionspartner Bindestellen ausbilden, die im Wildtyp Protein nicht präsent sind. So können z.B. intramolekulare Domänen, welche normalerweise auf der Proteinoberfläche nicht erscheinen, anwesend sein und dadurch eine nicht funktionelle Bindung vermitteln.

Um diesen Sachverhalt ausschließen zu können, wurden die Interaktion von Hop mit den Vollängen Versionen der identifizierten Interaktionspartner untersucht. Dazu wurden die amplifizierten Vollängen Gene der Interaktionspartner in den pGADT7 Vektor (Clontech) kloniert, welcher wie die Bibliotheksplasmide die Gal4-Aktivierungsdomäne enthält und nach Transformation in Hefe die Expression der Interaktionspartner in Fusion mit der Gal4AD erlaubt. Wird eines dieser Plasmide mit dem pGBKT7hopfl Plasmid in den Hefestamm AH109 transformiert und auf ausgewählten Selektionsplatten inkubiert, muss wiederum durch Rekonstitution eines aktiven Gal4-Transkriptionsfaktors die Expression

der Gal4-abhängigen Reportergene möglich sein. Mit dieser Methode kann die Interaktion von Hop und den identifizierten Vollängen-Interaktionspartnern in der Hefe untersucht werden.

### 2.2.1. Selbstaktivierungstest der Gal4AD-Cdc2-, Gal4AD-CG2944- und Gal4AD-CG17033-Fusionsproteine in Hefe

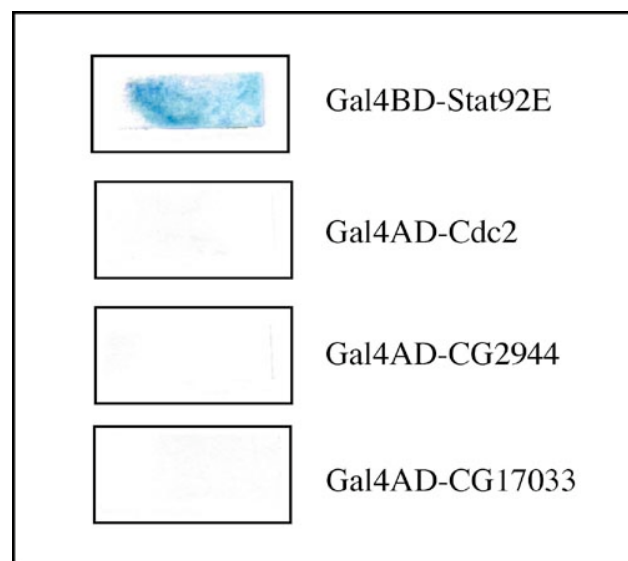
Um einen aussagefähigen *in vivo* Interaktionstest durchführen zu können, muss wie im YTHS gewährleistet sein, dass die identifizierten Interaktionspartner, welche in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne exprimiert werden, nicht von sich aus die Gal4-abhängigen *ade*- und *his*-Reportergene aktivieren können. Dazu wurden die pGADT7 Plasmide, welche die Gene der Interaktionspartner enthielten, in AH109 Hefezellen transformiert (4.13.2.). Nach der Transformation wurden die Hefezellen für 2 Tage bei 30°C auf Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten inkubiert und anschließend je zwei Klone nochmals auf Leu<sup>-</sup> und Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausgestrichen und bis zu einem deutlichen Wachstum bei 30°C inkubiert (Abbildung 13).



**Abbildung 13. Test auf chromosomale AH109 Reportergene-Aktivität durch die Gal4AD-Fusionsprotein.** (A) Gal4AD-Cdc2, (B) Gal4AD-CG2944, (C) Gal4AD-CG17033. Dokumentation von Hefeselektionsplatten. Zwei unabhängige plasmidhaltige Hefeklone wurden jeweils auf der gleichen Plattenhälfte ausgestrichen. Wachstum zeigt Aktivierung des jeweiligen Reportergens an. Leu<sup>-</sup>-Selektionsmedien enthalten kein Leu; Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien enthalten kein Leu, Ade und His. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.2.1..

Die getesteten Hefeklone wuchsen auf Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten und tragen somit das Plasmid, welches den Hop-Interaktionspartner in Fusion mit der Gal4AD exprimiert. Im Gegensatz dazu wuchsen die transformierten Hefezellen nicht auf Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien (Abbildung 13). Dies bedeutet, dass die Gal4AD-Fusionsproteine die Expression der chromosomalen Gal4-abhängigen *ade*- und *his*-Reportergene selbst nicht aktivieren können. Um eine Aktivierung des chromosomalen Gal4-abhängigen *lacZ*-Reportergens durch die Gal4AD-Fusionsproteine ausschließen zu können, wurde mit den verwendeten Hefeklonen ein  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest (4.13.5.) durchgeführt.

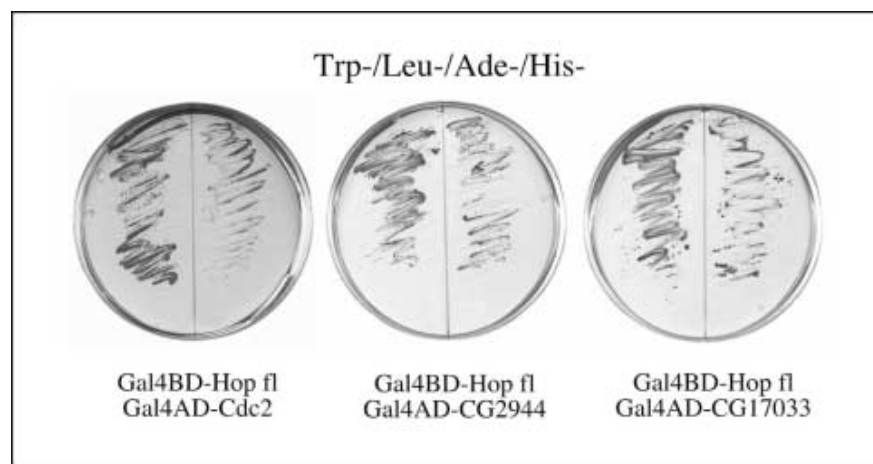
Die Auswertung dieses  $\beta$ -Galaktosidase Filtertests zeigt keine Aktivierung des chromosomalen Gal4-abhängigen *lacZ*-Reportergens (Abbildung 14). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Gal4AD-Fusionsproteine alle Gal4-abhängigen Reportergene des AH109 Hefestamms nicht aktivieren können und somit in einem aussagefähigen *in vivo* Interaktionstest mit Gal4BD-Hop fl verwendet werden können.



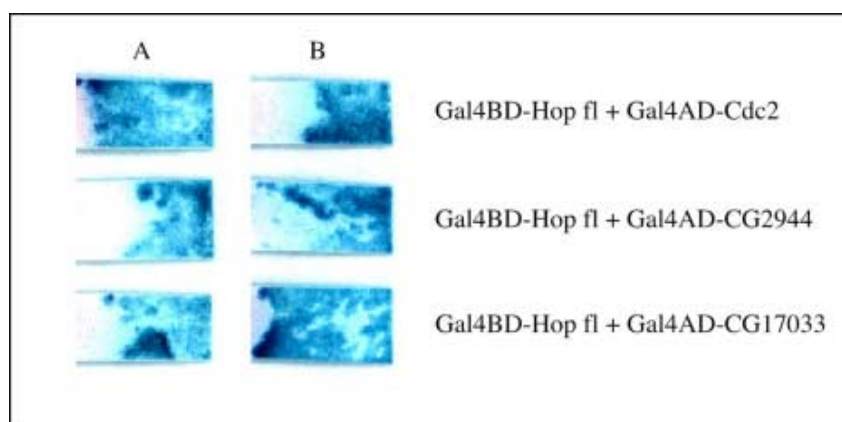
**Abbildung 14. Test auf *lacZ*-Reportergen-Aktivität durch die Gal4AD-Fusionsproteine.** Dokumentation von Membranen nach  $\beta$ -Galaktosidasetest. Blaufärbung zeigt Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Gal4BD-Stat92E ist ein selbstaktivierender Transkriptionsfaktor, der als Positivkontrolle fungiert. Gal4BD-Stat92E wird von dem Plasmid pGBT9*stat92E* kodiert. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.2.1..

### 2.2.2. Cdc2, CG2944 und CG17033 interagieren in ihrer Volllängenversion mit Hop in Hefe

Für den *in vivo* Interaktionstest wurde eine ÜNK der pGBKT7hopfl AH109-Hefekultur in Trp<sup>-</sup>-Selektionsmedium angesetzt, die am Folgetag mit den pGADT7 Plasmiden der Hop-Interaktionspartner, welche diese Proteine in Fusion mit der Gal4AD exprimieren, transformiert wurde (4.13.2.). Die Transformanten wurden auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden jeweils zwei Klone auf Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsplatten ausplattiert, um die Interaktion der beiden Voll-längenproteine zu testen (Abbildung 15).



**Abbildung 15. Interaktionstest zwischen Gal4BD-Hop fl und den Interaktionspartnern Gal4AD-Cdc2, Gal4AD-CG2944 und Gal4AD-CG17033.** Dokumentation von Hefeselektionsplatten. Wachstum der Hefe zeigt Aktivierung der Reportergene. Jeweils zwei unabhängige Klone wurden pro Interaktionstest verwendet. Trp<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/His<sup>-</sup>-Selektionsmedien enthalten kein Trp, Leu, Ade und His. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.2.2. und 4.14.2..



**Abbildung 16. Test auf *lacZ*-Reportergen-Aktivität durch die Interaktion von Gal4BD-Hop fl und den Gal4AD-Fusionsproteinen.** Dokumentation von Membranen nach  $\beta$ -Galaktosidasetest. Blaufärbung zeigt Aktivierung des *lacZ*-Reportergens. Je zwei unabhängige plasmidhaltige Hefeklone (A und B) wurden verwendet. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.2.2..

Des weiteren wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest (4.13.5.) durchgeführt, um zu analysieren, ob durch die funktionelle Interaktion neben den *ade*- und *his*-Reportergenen auch das chromosomale *lacZ*-Reportergen aktiviert werden kann (Abbildung 16).

Alle untersuchten Interaktionspartner, welche in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne in Hefe exprimiert wurden, können durch Interaktion mit Gal4BD-Hop fl einen funktionellen Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituieren und somit die Gal4-abhängigen Reportergene *ade* und *his* aktivieren. Die *in vivo* Interaktionstests von *hop* mit den Genen *cdc2*, *cg2944* und *cg17033* zeigten somit, dass diese Proteine in ihrer Vollängenversion in Hefe mit Hop interagieren.

Diese Beobachtungen wurden des weiteren durch den  $\beta$ -Galaktosidase Filtertest bestätigt, der die Aktivierung des dritten chromosomalen Gal4-abhängigen Reportergens *lacZ* durch funktionelle Interaktion aller drei Gene mit *hop* zeigt.

### 2.3. *In vitro* Hop-Interaktion mit Cdc2, CG2944 und CG17033

In der Zelle ist es möglich, dass durch ein drittes Protein eine indirekte Interaktion zweier Proteine vermittelt wird. Um eine direkte Interaktion nachzuweisen, wurde als zweiter Ansatz ein sogenannter *in vitro* Protein-Protein-Interaktionstest gewählt, der die Interaktion zweier rekombinanter Proteine in einem zellfreien *in vitro* System untersucht (4.17.). Hierzu wurde Flag-Hop-His mittels des Baculo-Virus Expressionssystems in *Sf9* Zellen exprimiert. Die Herstellung rekombinanter Viren und die Expression des Proteins erfolgte durch das pVL-Flag-*hop*-His Plasmid, welches die Expression von Hop mit einer COOH-terminalen Flag-Sequenz und einer NH<sub>2</sub>-terminalen 6xHis-Sequenz ermöglicht (4.15.1. und 4.15.2.). Das rekombinante Protein wurde aus Ganzzellextrakten der infizierten *Sf9*-Zellen in einem ersten Schritt mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-Chelatingmatrize gereinigt und in einem zweiten Schritt mit Hilfe von Agarose-gekoppelten anti-Flag-Antikörpern (Sigma) affinitätschromatografisch nochmals gereinigt und angereichert (4.15.5.).

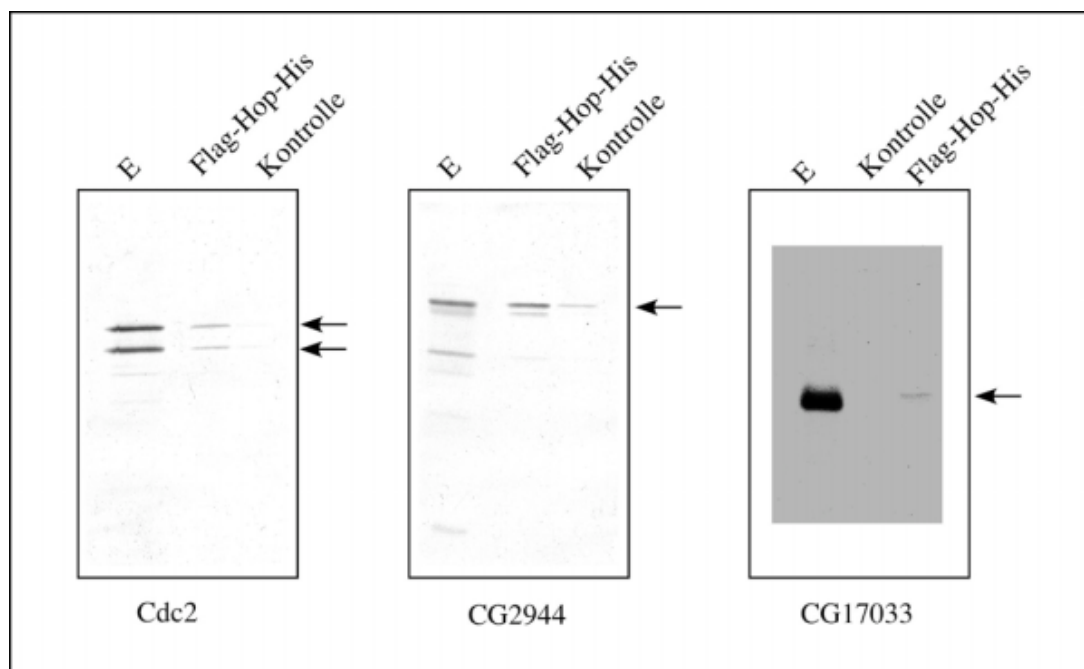
Die identifizierten Hop-Interaktionspartner wurden jeweils in den Vektor pT $\beta$ -Stop kloniert (4.11.11.) und unter Verwendung von <sup>35</sup>S-markiertem Methionin in einem *in vitro* Expressionssystem (TNT T7 Coupled Transcription-Translation Rabbit Reticulocyte Lysate System; Promega) exprimiert. Durch anschließende Inkubation von Hop und den radioaktiv-markierten Interaktionspartnern wurde untersucht, ob Cdc2, CG2944 und



CG17033 mit Hop auch in einem zellfreien *in vitro* System interagieren (4.18.). Der Vergleich Bindung-Hop gegen Bindung-Kontrolle zeigt, dass alle drei Proteine mit Hop interagieren. Im Gegensatz dazu bindet nur ein kleiner Anteil an die Kontrolle (Agarosegekoppelten anti-Flag-Antikörpern die in nicht infiziertem *Sf9* Ganzzellextrakt inkubiert wurden).

Die *in vitro* Expression von Cdc2 ergab eine Doppelbande, die aber mit annähernd gleicher Intensität an Hop bindet (Abbildung 17). Eventuell handelt es sich hierbei um einen Translationsabbruch. CG2944 bindet an Hop, wie auch ein geringerer Anteil an die Kontrolle. Im Vergleich mit der Hop-Interaktion besteht aber eine wesentlich schwächere Bindung, weshalb von einer funktionellen Bindung von CG2944 und Hop ausgegangen werden kann.

Die Hop-Bindung von CG17033 ist im Vergleich mit den anderen Interaktionspartnern und im Hinblick auf die eingesetzte Proteinmenge zwar schwächer, jedoch im Gegensatz zu der Kontrolle eindeutig zu erkennen (Abbildung 17). Die Bindung an Hop scheint unter den gewählten Bedingungen schwächer zu sein, als die Bindung von Hop an Cdc2 oder CG2944.



**Abbildung 17. *In vitro* Interaktion von Cdc2, CG2944 und CG17033 mit Hop im zellfreien System.** Dokumentiert wurden die Autoradiografien. Flag-Hop-His wurde mit den jeweiligen  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinen inkubiert, mehrmals gewaschen und in Proteingelprobenpuffer gekocht. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit anschließender Autoradiografie detektiert. E = Einsatz (1% der eingesetzten *in vitro*-Translationsreaktion). Kontrolle = Agarosegekoppelte anti-Flag-Antikörper die mit nicht infiziertem *Sf9* Ganzzellextrakt inkubiert wurden. Die Pfeile kennzeichnen die Interaktionsproteine. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.3..

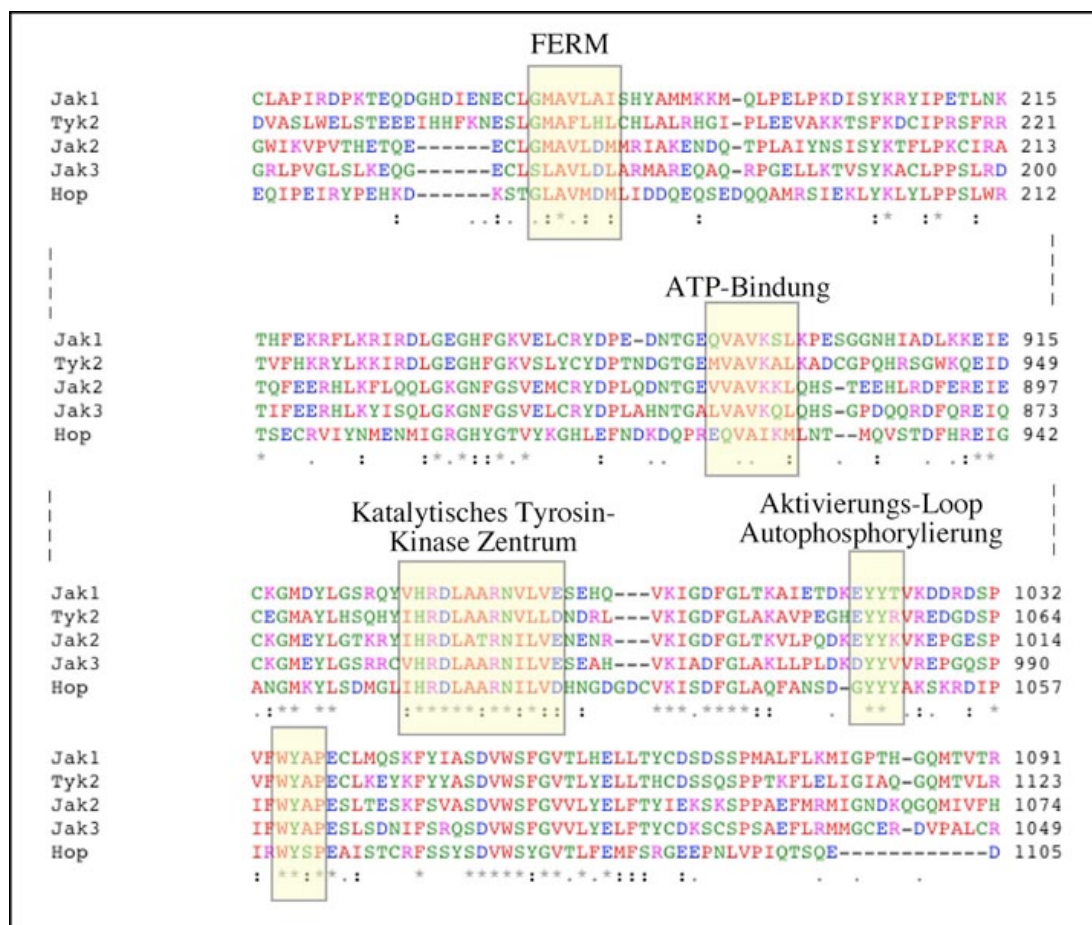
## 2.4. *In vitro* Kinase-Assays

In der vorliegenden Arbeit wurden Phospho-Kinase Assays mit rekombinanten Hop- und Cdc2-Proteinen durchgeführt, um die funktionelle Interaktion von Hop und Cdc2, wobei Cdc2 das Substrat von Hop darstellt, zu untersuchen. Die Hop- und Cdc2-Proteine wurden unter Verwendung des Baculo-Virus Expressions-Systems in *Sf9*-Zellen exprimiert (4.15.). Hop wurde als Fusionsprotein mit einer NH<sub>2</sub>-terminalen Flag-Sequenz und einer COOH-terminalen 6xHis Sequenz exprimiert, Cdc2 mit einer NH<sub>2</sub>-terminalen GST- und Flag-Sequenz (4.15.2.). Die Hop-Proteine wurden aus Ganzzellextrakten der infizierten Zellen mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-Chelatingmatrize und anschließend mit Hilfe Agarose-gekoppelter anti-Flag-Antikörper affinitätschromatografisch gereinigt (4.15.5.). Das Cdc2-Protein wurde im ersten Schritt mit Hilfe einer Glutathion-Agarose gereinigt (4.15.4.). In einem zweiten Reinigungsschritt wurde Cdc2 über eine Anionenaustauschsäule (SepharoseQ, Amersham Pharmacia) gereinigt und durch anschließende Bindung an Agarose-gekoppelter anti-Flag-Antikörper konzentriert (4.15.3.). Jeweils 5 µl der Hop-Protein-Agarose und Cdc2-Protein-Agarose wurden gemischt und mit <sup>32</sup>P-γ-ATP inkubiert (4.16.). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen auf ein Proteingel aufgetragen (4.12.3.) und die phosphorylierten Proteine durch Autoradiografie sichtbar gemacht.

Durch Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass Hop Cdc2 *in vitro* phosphoryliert (Abbildung 19 und 20). Ferner konnte belegt werden, dass die Hop-Mutante Hop<sup>Tum-I</sup> in einem *in vitro* Kinase-Assay im Vergleich zu Wildtyp Hop nicht hyperaktiv ist und ebenfalls wie Hop Cdc2 phosphoryliert (Abbildung 19 und 20). Durch diese Ergebnisse blieb weiterhin die Frage offen, ob die Kinaseaktivität, welche durch Phosphorylierung von Cdc2 beobachtet wurde, von Hop, oder von Kontaminationen aus dem *Sf9* Ganzzellextrakt stammen.

Um diese Frage beantworten zu können, wurden Kinase-inaktive Hop Mutanten erzeugt. Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine inaktiven Hop Punktmutanten beschrieben sind, wurden durch Sequenzvergleiche inaktiver humaner Janus-Kinasen auf mögliche inaktive Hop Mutanten geschlossen. Mit Hilfe von Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Punktmutante Jak3 D169E einen Austausch der konservierten Aminosäure Asparaginsäure an Position 169 in der FERM Domäne darstellt und somit die Rezeptorbindung und daraus folgend die Kinaseaktivität reduziert ist (Zhou *et al.*, 2001). Durch Studien der

humanen Janus-Kinase Tyk2 konnten drei konservierte Aminosäuren erforscht werden, die für die Kinaseaktivität von entscheidender Bedeutung sind. Durch *in vitro* Kinase-Assays konnte gezeigt werden, dass Tyk2 K930R, Y1054F und Y1055F für die Kinaseaktivität und die Phosphorylierung des bekannten Substrats INFAR-2 benötigt wird (Gauzzi *et al.*, 1996). Die selben Studien konnten dies für die wichtigen Aminosäuren Y1007 und Y1008 in Jak2 zeigen (Feng *et al.*, 1997). Durch Sequenzvergleiche der humanen Janus-Kinasen und Hop wurden die entsprechenden homologen Aminosäuren identifiziert (Abbildung 18).



**Abbildung 18. Sequenzvergleich humaner Janus-Kinasen mit Hop.** Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Sequenzvergleichs-Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) online abgeglichen. Konservierte wichtige Proteindomänen wurden eingerahmt. Die Abbildung stellt lediglich Abschnitte der Sequenzvergleiche dar. Die verglichenen Proteine sind links aufgeführt. Die Zahlen am rechten Rand geben die Aminosäure-Position der jeweiligen Proteine an. Für nähere Erläuterungen siehe 2.4.

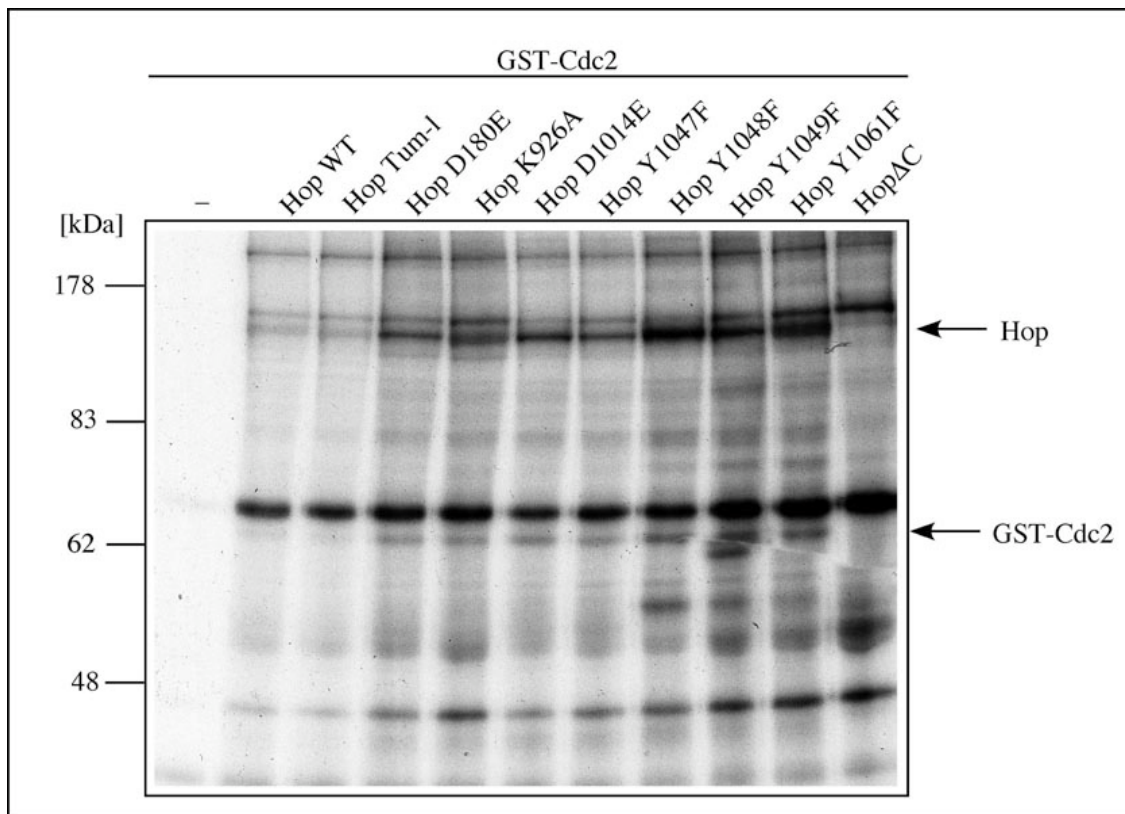
Durch den Vergleich der einzelnen Aminosäuren konnten die Hop Aminosäurereste identifiziert werden, deren Mutation in humanen Janus-Kinasen die Kinase-Aktivität inaktivieren. Da im Aktivierungs-Loop und in der Autophosphorylierungsstelle bei allen humanen

Janus-Kinasen zwei benachbarte Tyrosine konserviert sind, bei Hop dagegen aber drei, wurde auch dieser dritte Tyrosinrest mutiert, um dessen Auswirkung auf die Kinaseaktivität von Hop zu erhalten. Durch *in vitro* Mutagenese-Reaktionen (Stratagene) (4.11.13.) wurden Hop-Mutanten generiert und auf Kinase-Aktivität hin untersucht (Tabelle 6). Des weiteren wurde eine Deletionsmutante von Hop hergestellt (Hop $\Delta$ C), die durch eine C-terminale Deletion die Janus-Kinase Homologie-Regionen (JH) 1 bis 3 nicht mehr exprimieren kann. Durch diese Deletion wird weder die Kinase- noch die Kinase-ähnliche Domäne exprimiert.

Aminosäure-Austausch	Inaktive Mutation in	Generierte Mutation in Hop	Referenz
D169E	Jak3	D180E	Zhou <i>et al.</i>
K930R	Tyk2	K926A	Gauzzi <i>et al.</i>
D996E	Jak2	D1014E	Kohlhuber <i>et al.</i>
Y1007F	Jak2	Y1047F	Feng <i>et al.</i>
Y1054F	Tyk2		Gauzzi <i>et al.</i>
Y1008F	Jak2	Y1048F	Feng <i>et al.</i>
Y1055F	Tyk2		Gauzzi <i>et al.</i>
		Y1049F	
Y1068F	Tyk2	Y1061F	Gauzzi <i>et al.</i>

**Tabelle 6. Übersicht über die inaktiven humanen und generierten *Drosophila* Janus-Kinasen.** Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.4. und Abbildung 18.

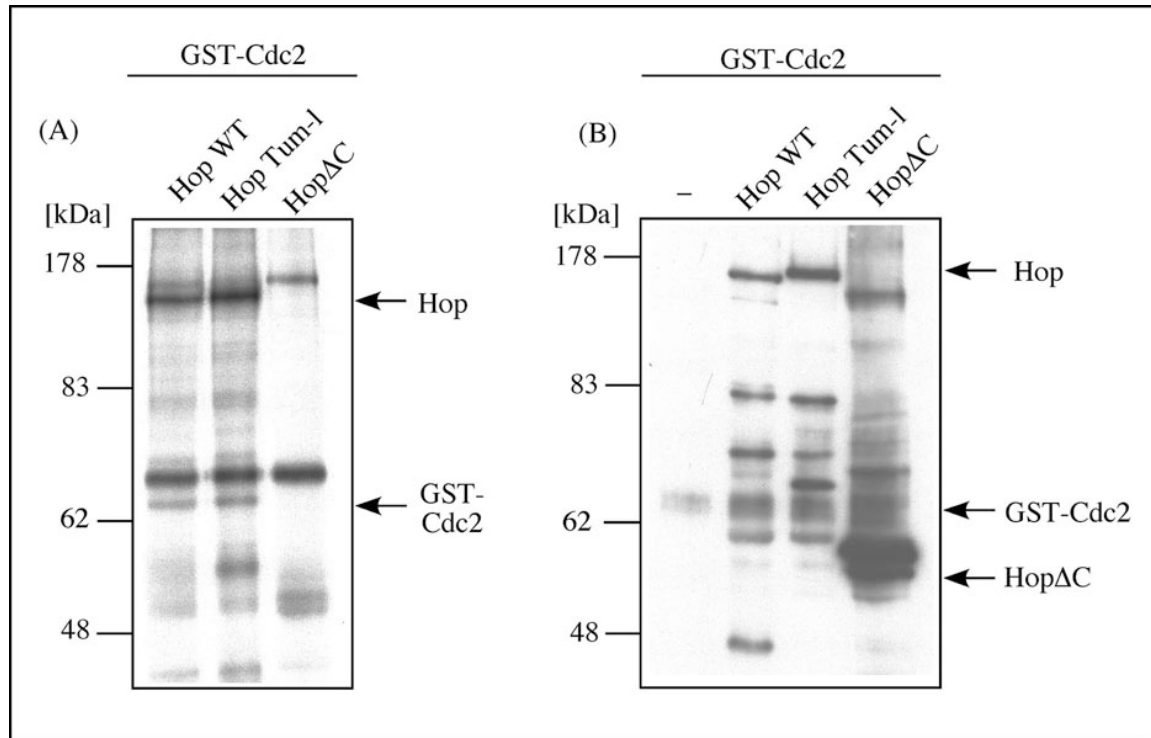
Die Hop-Mutanten und das Hop-Deletionskonstrukt wurden aus Ganzzellextrakt der infizierten *Sf9*-Zellen mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-Chelatingmatrize und anschließend mit Agarose-gekoppelter anti-Flag-Antikörper affinitätschromatografisch gereinigt (4.15.5.). Jeweils 5  $\mu$ l der verschiedenen Hop-Protein-Agarose und der Cdc2-Protein-Agarose wurden gemischt und mit <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP inkubiert (4.16.). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionen auf ein Proteingel aufgetragen. Durch anschließende Autoradiografie über Nacht wurden die phosphorylierten Proteine detektiert (Abbildung 19).



**Abbildung 19. Phosphorylierung von GST-Cdc2 durch Hop Proteine *in vitro*.** Dokumentiert wurde die Autoradiografie. Flag-Hop-His Proteine wurden mit GST-Cdc2 Protein in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit anschließender Autoradiografie detektiert. Die Positionen der Proteine wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Das relative Proteingewicht ist in kDa angegeben. Für nähere Erläuterungen siehe 2.4..

Die Ergebnisse zeigen die Phosphorylierung von Cdc2 durch das Wildtyp Hop Protein, durch Hop<sup>Tum-1</sup> und die generierten putativ inaktiven Punktmutanten. Bei der Inkubation von GST-Cdc2 mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP ohne Hop-Protein ist keine Phosphorylierung von Cdc2 zu erkennen. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass Cdc2 durch kontaminierende Kinasen oder durch Autokinaseaktivität phosphoryliert wird. Die postulierten inaktiven Punktmutanten zeigen in diesem *in vitro* Kinase-Assay sowohl Autokinaseaktivität, als auch Transkinaseaktivität. Dagegen ist bei der Deletionsmutante Hop $\Delta\text{C}$  keine Phosphorylierung von Cdc2 zu erkennen. Vergleiche der Proteinmengen durch eine Western-Blot Analyse der eingesetzten Hop-Proteine (Daten nicht gezeigt) ließ erkennen, dass die Menge an Hop WT und Hop<sup>Tum-1</sup> wesentlich geringer war, als die der Punktmutanten. Dadurch ergab sich die „geringere“ Aktivität dieser Proteine in dem Kinase-Assay. Um diese Vermutung zu belegen, wurden die Proteinmenge von Hop WT, Hop<sup>Tum-1</sup> und Hop $\Delta\text{C}$  einander angeglichen und in einem weiteren Kinase-Assay verwendet. Die Hop-Punktmutanten wurden aufgrund ihrer fehlenden Inaktivität nicht weiter verwendet. Parallel dazu

wurde eine Phosphorylierungsreaktion unter den gleichen Bedingungen mit nicht-radioaktivem ATP durchgeführt, um durch eine spätere Western-Blot Analyse die Position der Proteine im SDS-Gel bestimmen zu können.



**Abbildung 20. Phosphorylierung von GST-Cdc2 durch Hop-Proteine *in vitro*.** (A) Hop Proteine wurden mit GST-Cdc2 in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP inkubiert. (B) Hop Proteine wurden mit GST-Cdc2 in Gegenwart von nicht-radioaktivem ATP inkubiert. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit anschließender Autoradiografie (A), oder mittels Western-Blot Analyse (anti-Flag 1:2000) detektiert (B). Das relative Molekulargewicht der Proteine ist in kDa dargestellt. Die Positionen der Proteine wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Für nähere Erläuterungen siehe 2.4..

Der Western-Blot (4.12.4.) der nicht-radioaktiv markierten Proteine lässt erkennen, dass in diesem Assay gleiche Mengen an Hop Proteinen verwendet wurden (Abbildung 20B). Anhand dieser Analyse konnte auch die Position dieser Proteine im Autoradiogramm bestimmt werden. Wie vermutet wurde, können Hop WT und Hop<sup>Tum-1</sup> in diesem Assay GST-Cdc2 phosphorylieren (Abbildung 20A). Die Intensität der Phosphorylierung ist bei beiden Proteinen gleich. Im Gegensatz dazu erfolgt keine Phosphorylierung von GST-Cdc2 durch das Deletionskonstrukt HopΔC. Daraus kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von Cdc2 durch Hop vermittelt wird und nicht durch eine Kontaminante, welche mit dieser Kinase aus dem *Sf9* Ganzzelextrakt gereinigt wurde.

## 2.5. *In vivo* Einfluss der Hop-Cdc2 Interaktion auf die Hämatopoese in *Drosophila melanogaster*

Untersuchungen der gain-of-function Mutanten Hop<sup>Tum-1</sup> und Hop<sup>T42</sup> der Jak/Stat Signaltransduktionskaskade haben eine erhöhte Anzahl der zirkulierenden Hämocyten zur Folge (Luo *et al.*, 1995; Lemaitre *et al.*, 1995). Wie gezeigt werden konnte, supprimiert eine Mutation in Stat92E die Tumorbildung in hop<sup>Tum-1</sup> Mutanten, jedoch nicht die Hyperproliferation der Hämocyten und die Differenzierung zu Lamellozyten (Hou *et al.*, 1996; Perrimon *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis zeigt, dass Hop mit anderen Faktoren interagiert und kommuniziert, um die Proliferation der Hämocyten zu steuern.

Der in dieser Arbeit identifizierte Hop-Interaktionspartner Cdc2 stellt einen überaus interessanten Kandidaten dar, da er durch seine direkte Beteiligung am Zellzyklus die Regulation der Hämatopoese direkt beeinflussen kann. Hop könnte in diesem Fall durch eine spezifische Phosphorylierung Cdc2 aktivieren und den Übergang von der G2 in die M Phase des Zellzyklus vermitteln.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden verschiedene *in vivo* Ansätze gewählt. Zuerst wurde die funktionelle Bedeutung der Hop-Cdc2 Interaktion für die Hämatopoese mit Hilfe von Gendosisanalysen untersucht. Im Falle einer funktionellen Interaktion von Hop und Cdc2 müsste eine *cdc2* Mutante, welche ein defektes inaktives Genprodukt exprimiert, die Hyperproliferation und die Differenzierung der Lamellozyten, die wiederum durch die dominante Temperatur-sensitive konstitutiv aktive Mutante hop<sup>Tum-1</sup> vermittelt wird, supprimieren können. Dazu wurden mutante heterozygote hop<sup>Tum-1</sup> Fliegen mit mutanten heterozygoten *cdc2* Fliegen gekreuzt und die doppelt mutanten heterozygoten Larven des dritten Entwicklungsstadiums der F1 Generation auf ihren charakteristischen Blutzell-Phänotyp hin untersucht. Zum einen wurden zirkulierende Blutzellen fixiert und phänotypisch analysiert, zum anderen wurde die Anzahl der zirkulierenden Blutzellen bestimmt. Außerdem wurden die Lymphdrüsen aus Larven des dritten Entwicklungsstadiums der verschiedenen Genotypen präpariert, um feststellen zu können, ob die charakteristische Vergrößerung der Lymphdrüse in hop<sup>Tum-1</sup> Mutanten ebenfalls supprimiert wird.



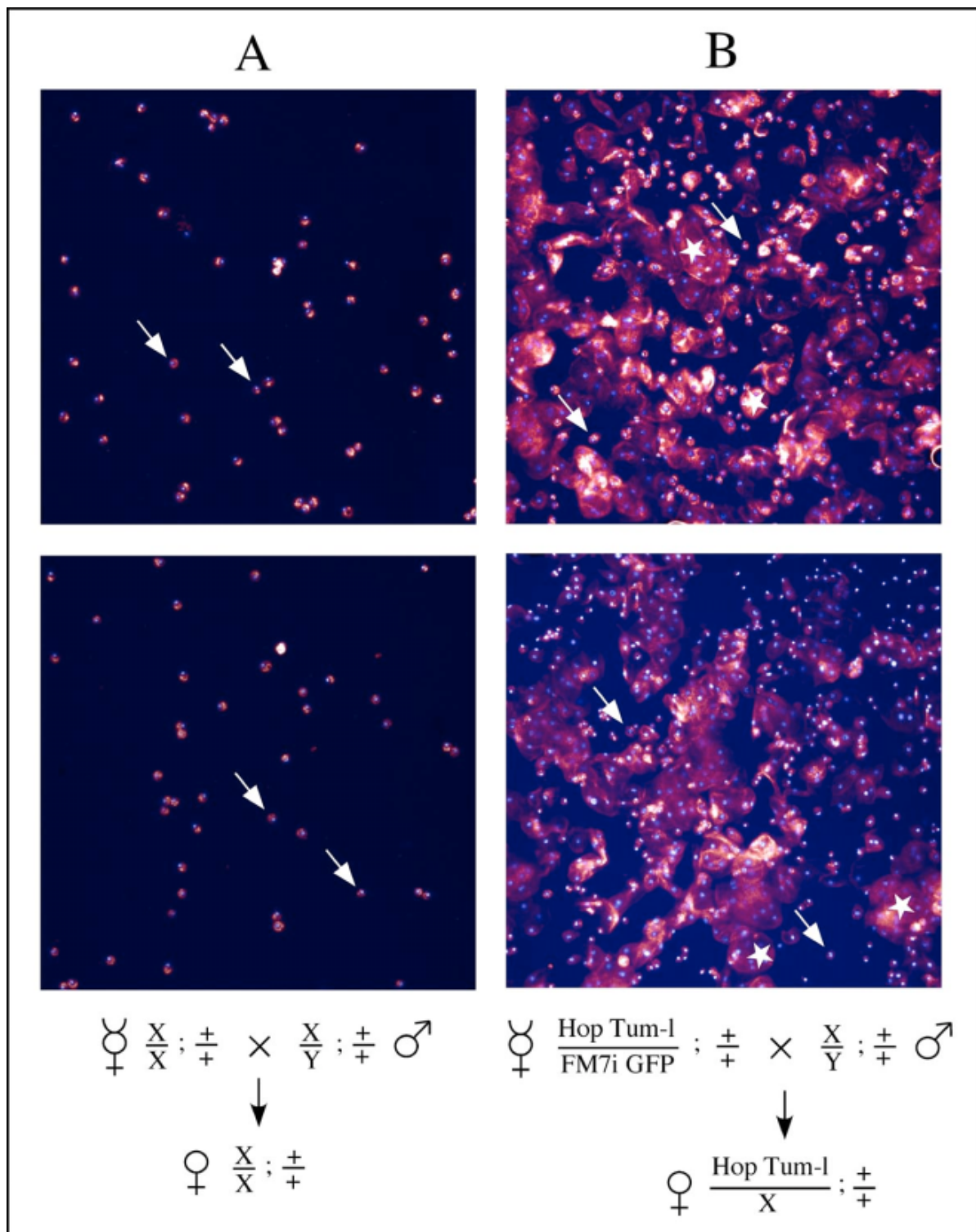
### 2.5.1. *Cdc2* Mutanten supprimieren den *hop*<sup>*Tum-l*</sup> Hämozyten-Phänotyp *in vivo* - eine quantitative Analyse

Zur quantitativen Analyse der Hämozyten der Larve des dritten Entwicklungsstadiums wurden die Fliegen des entsprechenden Genotyps gekreuzt (4.14.4.) und die Larven der F1 Generation nach ihrem Genotyp mit Hilfe larvaler Marker sortiert. Für die Präparationen wurden wie in allen nachfolgenden Untersuchungen nur weibliche Larven verwendet (4.14.5.). Die jeweils zu untersuchenden Larven wurden gewaschen, die Hämolymphe entnommen, fixiert und durch Färbung mit DAPI und Blutzell-spezifischen Antikörpern gefärbt (4.14.6.). Anschließend wurden die Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie dokumentiert.

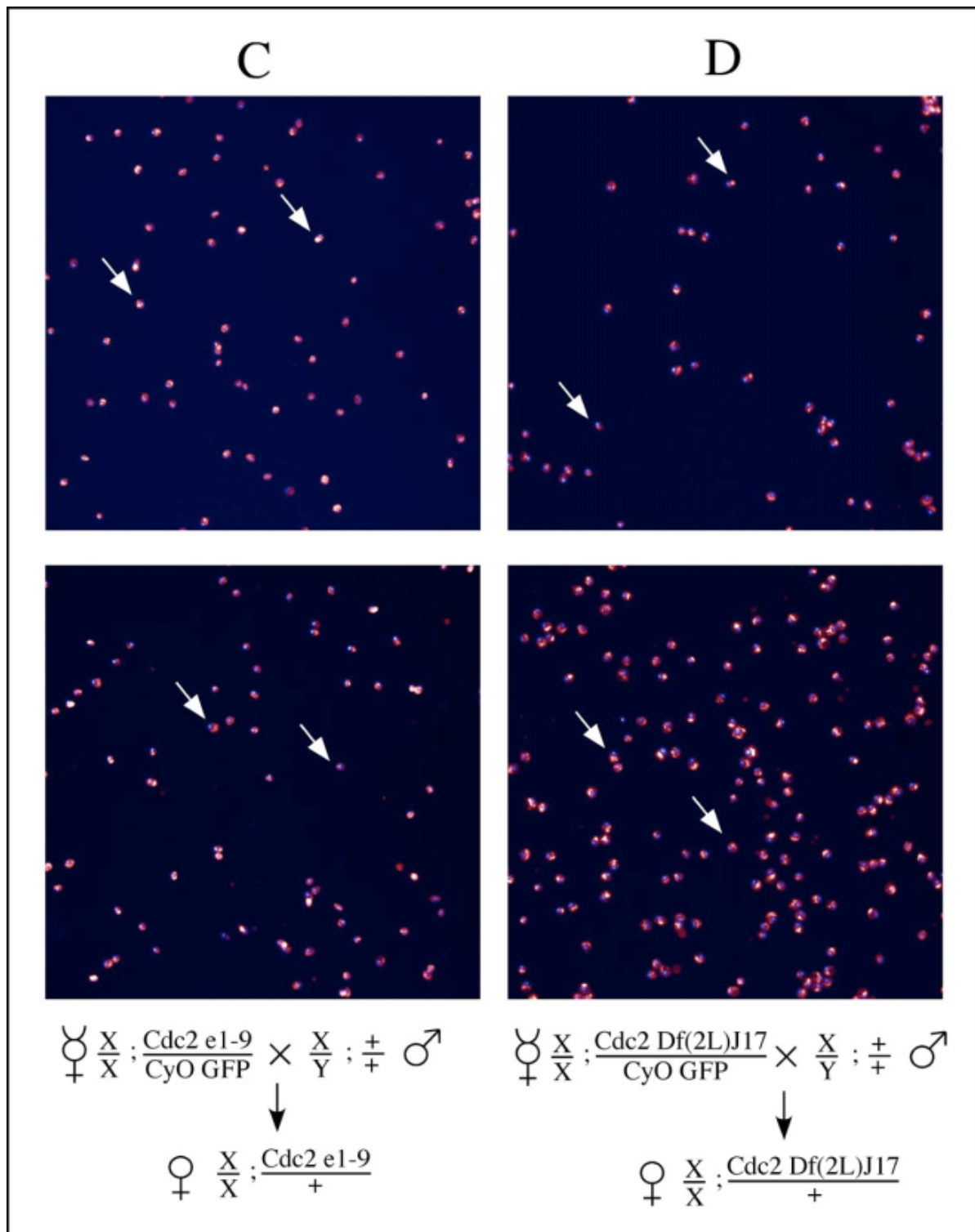
Als Kontrolle wurden unter anderem Wildtyp Fliegen benutzt, um die zirkulierenden Blutzellen der Wildtyp Situation dokumentieren zu können. Neben der *hop*<sup>*Tum-l*</sup> Mutante wurde die *cdc2* Mutante *cdc2*<sup>*E1-9*</sup> und die *cdc2*-defizitären Fliegenstämme Df(2L)J17, Df(2L)J27 und Df(2L)J77 benutzt. Die Mutante *cdc2*<sup>*E1-9*</sup> enthält den Aminosäureaustausch P242S im *cdc2* Gen, welches zur Expression eines inaktiven Genprodukts führt. Die Df(2L) Fliegenstämme enthalten jeweils eine Teildeletion des 2. Chromosoms, welche das *cdc2* Gen deletiert. Um zu testen ob etwaige Effekte auf Cdc2 und nicht auf generellen Zellzyklusdefekten basieren, wurde als Kontrolle *string* Fliegen benutzt. *String* ist eine *cdc2* Phosphatase, welche durch Dephosphorylierung Cdc2 aktiviert. Die verwendeten mutanten Fliegenstämme sind *stg*<sup>*AR2*</sup> und *stg*<sup>*7M53*</sup>. *Stg*<sup>*7M53*</sup> enthält eine Punktmutation innerhalb des *stg* Gens, welches zu einem inaktiven Genprodukt führt. Die *stg*<sup>*AR2*</sup> Fliegenmutante enthält ein inseriertes P-Element, welches das *stg* Gen inaktiviert.

Bei der Präparation der larvalen Hämozyten der Wildtyp Fliege kann man ausschließlich Plasmatozyten erkennen (Abbildung 21A). Plasmatozyten sind runde Zellen, die sich deutlich von den größeren abgeflachten Lamellozyten unterscheiden. Der Blutzell-spezifische Antikörper bindet an Oberflächenstrukturen sowohl der Plasmatozyten, als auch der Lamellozyten. Diese sind in den gezeigten Aufnahmen rot dargestellt.

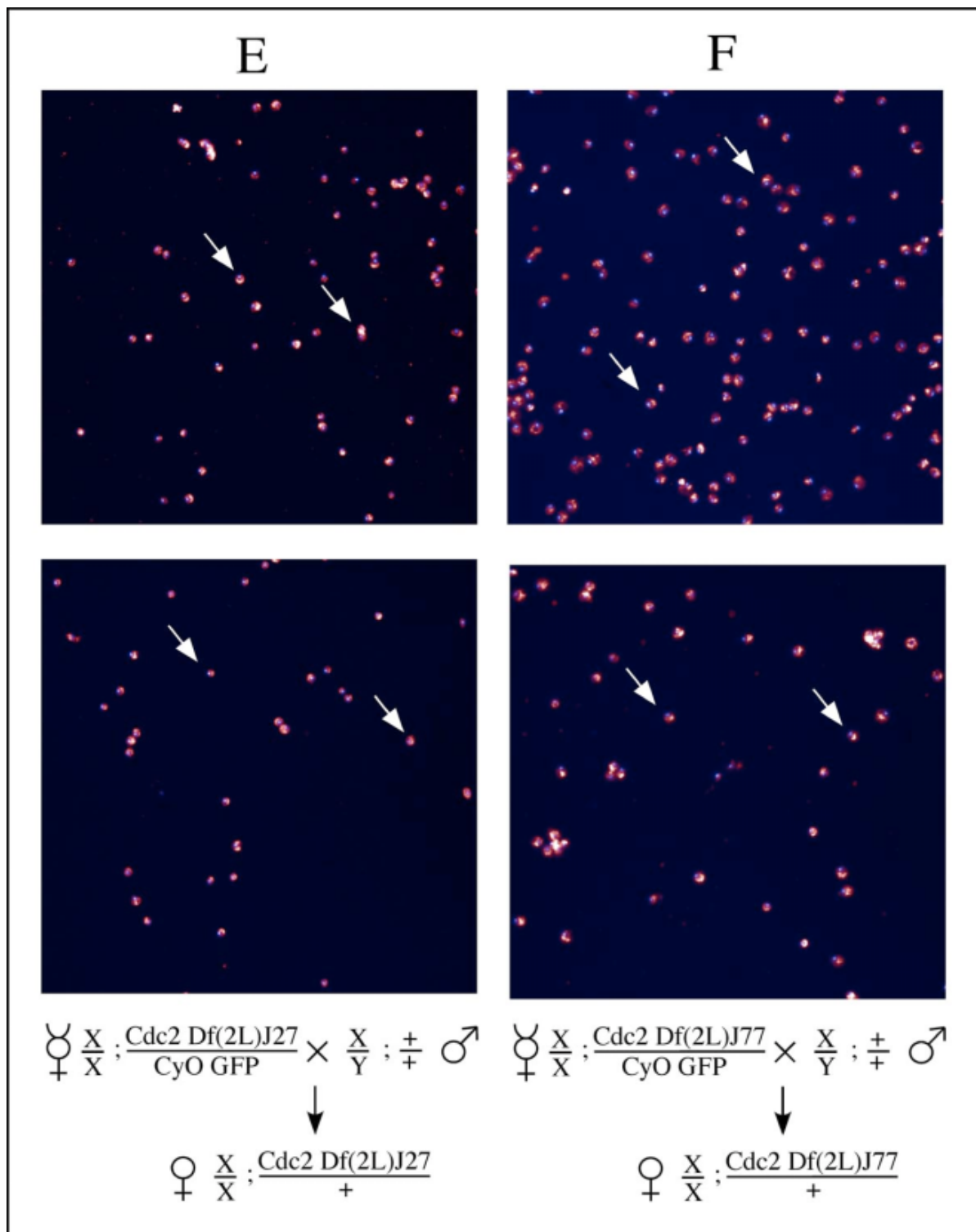




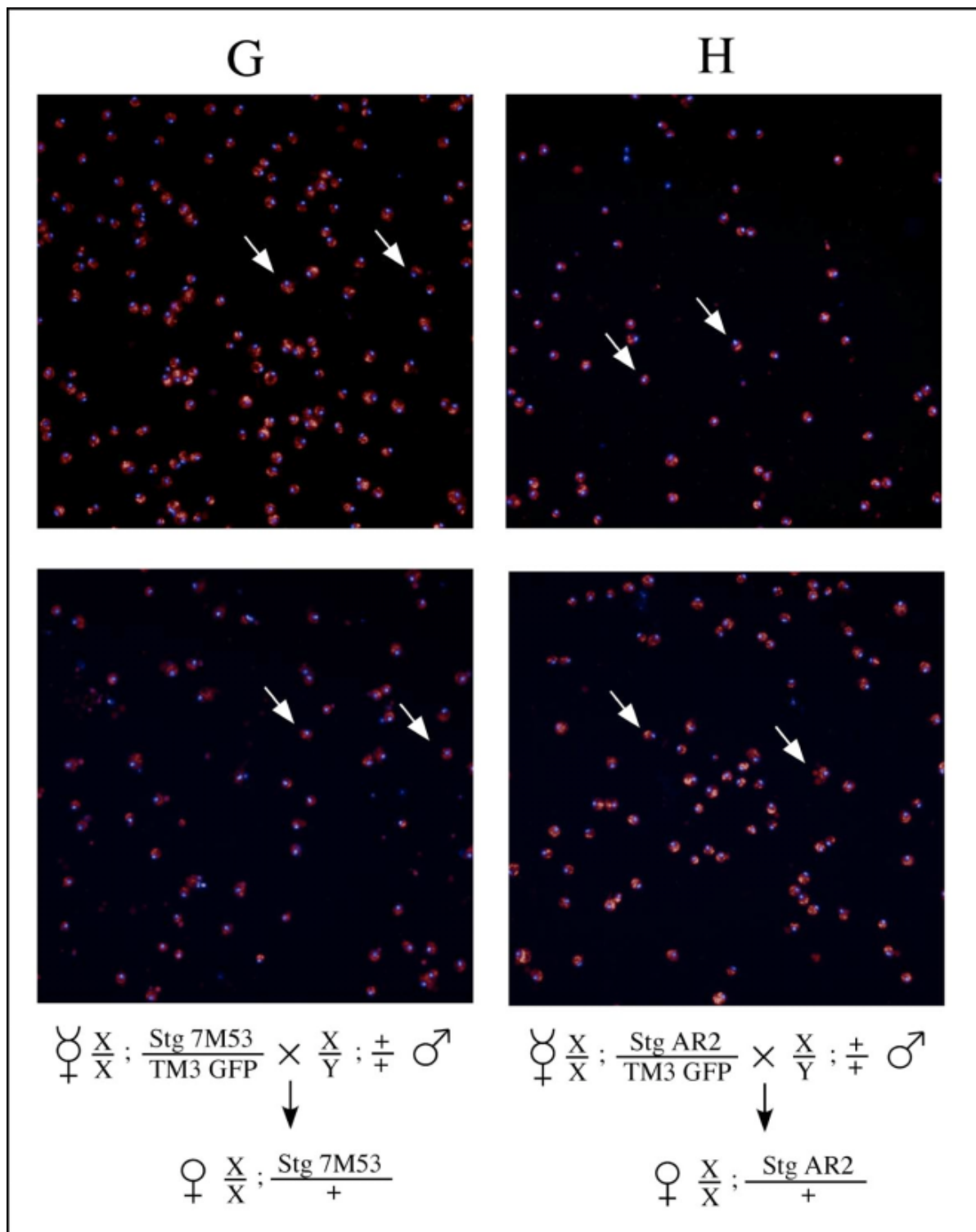
**Abbildungen 21A und 21B. Hämozyten Präparation von Wildtyp Fliegen (A) und heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>* Fliegen (B).** Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert; Lamellozyten sind mit Sternen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel. FM7i = dominanter Marker für das X-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..



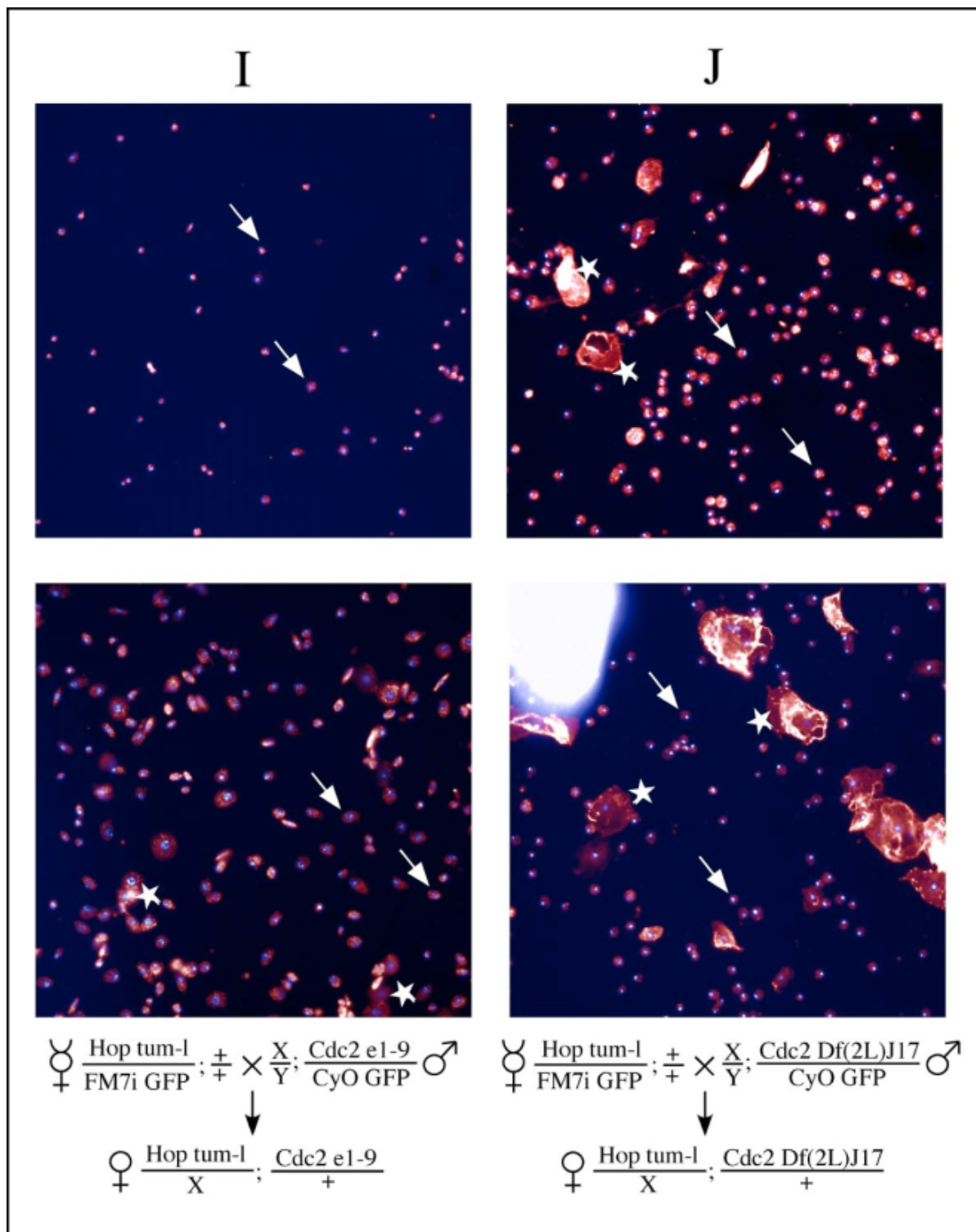
**Abbildungen 21C und 21D. Hämozyten Präparation von heterozygoten *cdc2<sup>e1-9</sup>* Fliegen (C) und heterozygoten *cdc2 Df(2L)J17* Fliegen (D).** Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel; CyO = dominanter Marker für das 2.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..



**Abbildungen 21E und 21F. Hämozyten Präparation von heterozygoten *cdc2 Df(2L)J27* Fliegen (E) und heterozygoten *cdc2 Df(2L)J77* Fliegen (F).** Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel; CyO = dominanter Marker für das 2.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..

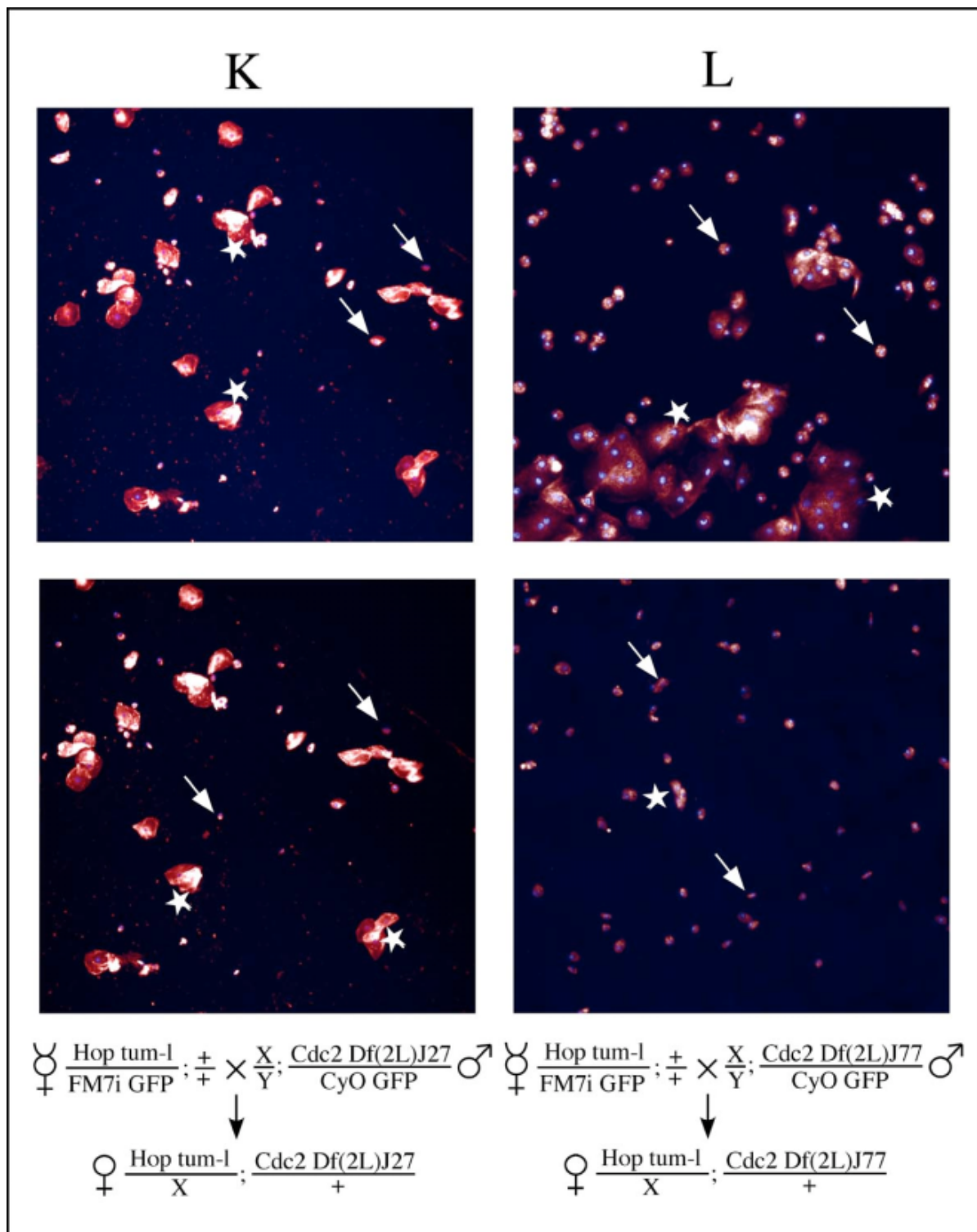


**Abbildungen 21G und 21H. Hämozyten Präparation von heterozygoten *stg*<sup>7M53</sup> Fliegen (G) und heterozygoten *stg*<sup>AR2</sup> Fliegen (H).** Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel; TM3 = dominanter Marker für das 3.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..

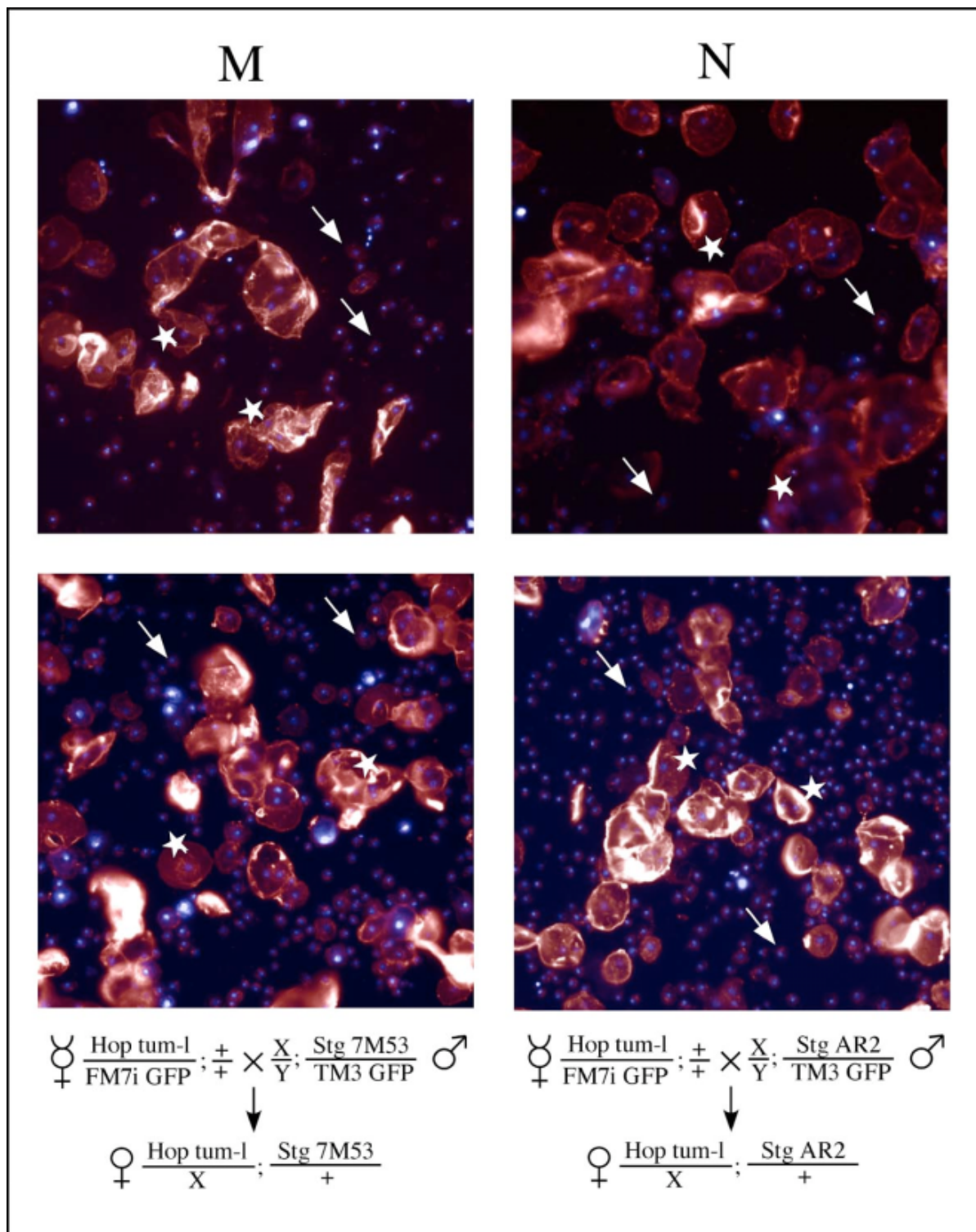


**Abbildungen 21I und 21J. Hämazyten Präparation von doppel-heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/cdc2<sup>e1-9</sup>* Fliegen (I) und doppel-heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/cdc2 Df(2L)J17* Fliegen (J). Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämazyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert; Lamellozyten sind mit Sternen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel. FM7i = dominanter Marker für das X-Chromosom; CyO = dominanter Marker für das 2.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..**





**Abbildungen 21K und 21L. Hämozyten Präparation von doppelt-heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>/cdc2 Df(2L)J27* Fliegen (K) und doppelt-heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>/cdc2 Df(2L)J77* Fliegen (L).** Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatocyten sind mit Pfeilen markiert; Lamellocyten sind mit Sternen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel. FM7i = dominanter Marker für das X-Chromosom; CyO = dominanter Marker für das 2.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..



**Abbildungen 21M und 21N. Hämozyten Präparation von doppelt-heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>/stg<sup>7M53</sup>* Fliegen (M) und doppelt-heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>/stg<sup>AR2</sup>* Fliegen (N). Unten: schematische Darstellungen der Kreuzungsschemen. Oben: Fotografien von DAPI- und Antikörper-gefärbten Hämozyten. Plasmatozyten sind mit Pfeilen markiert; Lamellozyten sind mit Sternen markiert. DAPI Färbung ist in Blau dargestellt, die Antikörper-Färbung in Rot. X = X-Chromosom; Y = Y-Chromosom; + = Wildtyp-Allel. FM7i = dominanter Marker für das X-Chromosom; TM3 = dominanter Marker für das 3.-Chromosom; GFP = Green fluorescent protein. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.1..**

Anhand der Färbungen der Blutzellen der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante kann man erkennen, dass es zu einer massiven Überproliferation der Plasmatozyten und zu einer Differenzierung der Lamellozyten kommt (Abbildung 21B). Plasmatozyten sind kleine rundliche Zellen. Im Vergleich dazu sind die Lamellozyten mindestens 5-10x größer und weisen eine flache oval bis dreieckige Form auf. Schon durch diese Färbungen kann man vermuten, dass die Hyperproliferation der Blutzellen mindestens doppelt so viele Blutzellen wie in der Wildtyp Situation hervorbringt.

Die Präparationen der *cdc2* und *string* Mutanten zeigen eine Wildtyp ähnliche Population der Blutzellen (Abbildungen 21C - 21H). Lamellozyten, wie sie durch die dominante Temperatur-sensitive konstitutiv aktive Mutante *hop<sup>Tum-l</sup>* hervorgerufen werden, sind in der Wildtyp Situation und in den *cdc2* und *string* Mutanten nicht zu erkennen. Heterozygote Doppelmutanten, die durch Kreuzungen der *hop<sup>Tum-l</sup>* mit den *cdc2* Mutanten erzeugt wurden, zeigen eine charakteristische Veränderung der Blutzell Population (Abbildung 21I - 21L). Obwohl die Anzahl der Plasmatozyten und Lamellozyten auch innerhalb des gleichen Genotyps unterschiedlich sein können, ist deutlich zu erkennen, dass im Vergleich zu *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutanten die Überproliferation der Hämozyten in *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2/+* Mutanten supprimiert und die Differenzierung der Lamellozyten reduziert ist.

Heterozygote Doppelmutanten, die durch Kreuzungen der *hop<sup>Tum-l</sup>* mit den *string* Mutanten erzeugt wurden, zeigen dagegen keine Supprimierung der Proliferation der Plasmatozyten und Differenzierung der Lamellozyten (Abbildung 21M - 21N). Hieraus kann geschlossen werden, dass Hop eine funktionelle Interaktion *in vivo* mit Cdc2 eingeht und die Supprimierung des *hop<sup>Tum-l</sup>* Blutzell-Phänotyps nicht durch die Beeinflussung einer Zellzyklus Komponente verursacht wird.

### **2.5.2. *Cdc2* Mutanten supprimieren den *hop<sup>Tum-l</sup>* Hämozyten-Phänotyp *in vivo* - eine qualitative Analyse**

Die Färbungen der Zellpräparate sprechen dafür, dass Cdc2 eine funktionelle Interaktion mit Hop eingeht und über dieses Signal die Entwicklung der Hämozyten gesteuert wird. Um diese Hypothese mit qualitativen Daten zu unterstützen, wurde die Anzahl der Blutzellen der jeweiligen Phänotypen bestimmt. Dazu wurden die unter Punkt 2.5.1. generierten Kreuzungen angesetzt (4.14.4.) und die erhaltenen Larven des dritten Entwicklungsstadiums untersucht. Die Larven wurden entsprechend ihres Genotyps sortiert und die Weib-



chen von den Männchen getrennt (4.14.5.) Die Hämolymphe wurde gesammelt und die Zellzahl der Hämozytentypen bestimmt (4.14.5. und 4.14.7.).

Die Zählung der Wildtyp Hämozyten, sowie die der heterozygoten *cdc2* und *string* Mutanten ergaben eine vergleichbare Anzahl von Plasmatozyten (Tabelle 7, Abbildung 22). Lamellozyten waren nicht zu beobachten.

Larven der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante zeigen auch in diesem Versuch die charakteristische Überproliferation der Hämozyten und Proliferation der Lamellozyten. Durch diese Methode konnte festgestellt werden, dass die Überproliferation der Hämozyten um einen Faktor von ungefähr 2,2 gegenüber der Wildtyp Larve erhöht ist. Überdies sind die flachen Lamellozyten präsent, die normalerweise nur im Falle einer Infektion der Larve nachgewiesen werden können. Die Lamellozyten machen hier etwa 33,5 % der gesamten Hämozyten Population aus.

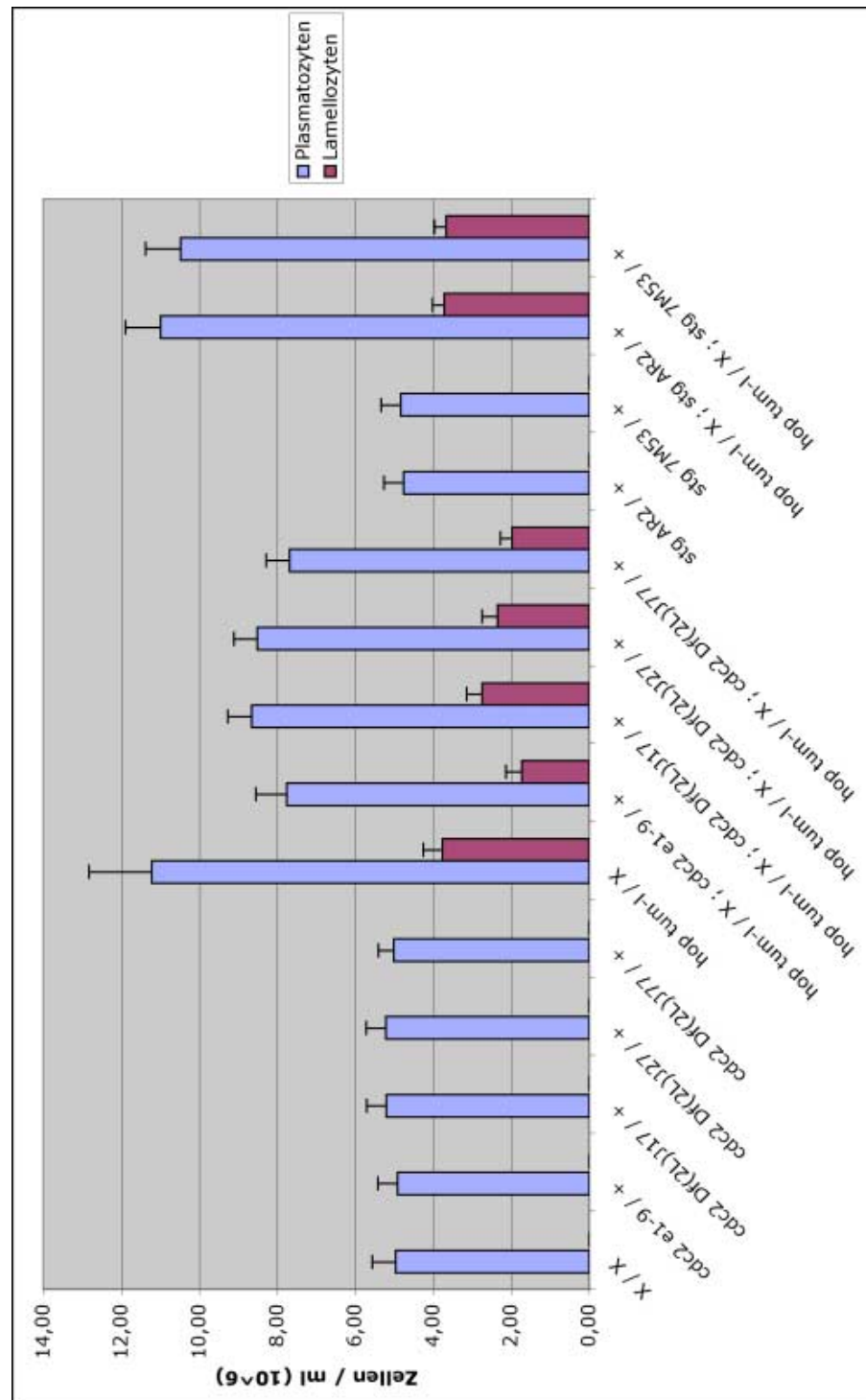
In *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2/+* Larven konnte eine Reduktion der Gesamtzellzahl beobachtet werden. So werden je nach *cdc2* Mutante die Gesamtzellzahl der Plasmatozyten von etwa 224 in der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante auf etwa 153 bis 173 in den heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2/+* Doppelmutanten reduziert. Im Vergleich mit der Gesamtzellzahl in Wildtyp Larven von 100 stellt das eine signifikante Reduktion dar. Der selbe Sachverhalt kann bei den Lamellozyten beobachtet werden. Hier sinkt die Gesamtzellzahl von etwa 75 in der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante auf etwa 34 bis 51 in den heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2/+* Doppelmutanten.

Die als Kontrollen eingesetzten *string* Mutanten zeigen im heterozygoten Genotyp eine den Wildtyp Larven identische Population der Hämozyten. Es können auch in der Hämolymphe dieser Larven keine Lamellozyten festgestellt werden und die Gesamtzellzahl der Plasmatozyten von ungefähr 97 ist der der Wildtyp Situation vergleichbar. Die heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/X;string/+* Doppelmutanten weisen keine signifikante Suppression der Hämozyten auf, wie es in den Fällen der heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2/+* Doppelmutanten der Fall ist. Es konnte weder die Anzahl der Plasmatozyten supprimiert, noch die Anzahl der Lamellozyten reduziert werden.

Diese Daten belegen somit, dass die heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>/X;string/+* Doppelmutanten die vollständige Ausprägung des *hop<sup>Tum-l</sup>* Phänotyps zeigen und somit keine Suppression durch String erfolgen kann. Diese Tatsache deutet wiederum darauf hin, dass die Suppression der Überproliferation der Hämozyten und die Reduktion der Differenzierung der Lamellozyten in der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante spezifisch durch die funktionelle Interaktion mit *cdc2* supprimiert wird.

Genotyp	Anzahl Proben	Ø Plasmatozyten ± Stabw	Ø Lamellozyten ± Stabw.
<i>X / X</i>	19	99,26 ± 11,89	0,00
<i>cdc2 e1-9 / +</i>	18	98,44 ± 9,64	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J17 / +</i>	18	104,00 ± 10,34	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J27 / +</i>	20	104,40 ± 9,89	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J77 / +</i>	19	100,21 ± 8,72	0,00
<i>hop tum-l / X</i>	20	224,40 ± 31,54	75,10 ± 9,82
<i>hop tum-l / X ; cdc2 e1-9 / +</i>	17	155,00 ± 15,77	34,52 ± 6,70
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J17 / +</i>	18	173,17 ± 13,65	51,50 ± 8,10
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J27 / +</i>	17	170,29 ± 11,36	46,94 ± 7,12
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J77 / +</i>	16	153,56 ± 12,55	39,63 ± 6,24
<i>stg AR2 / +</i>	20	95,50 ± 9,18	0,00
<i>stg 7M53 / +</i>	20	96,60 ± 9,58	0,00
<i>hop tum-l / X ; stg AR2 / +</i>	19	219,89 ± 17,09	74,42 ± 6,02
<i>hop tum-l / X ; stg 7M53 / +</i>	21	209,62 ± 17,62	73,33 ± 6,49
Genotyp		Ø Plasmatozyten ± Stabw. (10 <sup>6</sup> /ml)	Ø Lamellozyten ± Stabw. (10 <sup>6</sup> /ml)
<i>X / X</i>		4,96 ± 0,57	0,00
<i>cdc2 e1-9 / +</i>		4,92 ± 0,48	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J17 / +</i>		5,20 ± 0,52	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J27 / +</i>		5,22 ± 0,49	0,00
<i>cdc2 Df(2L)J77 / +</i>		5,01 ± 0,44	0,00
<i>hop tum-l / X</i>		11,22 ± 1,59	3,76 ± 0,49
<i>hop tum-l / X ; cdc2 e1-9 / +</i>		7,75 ± 0,76	1,73 ± 0,34
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J17 / +</i>		8,66 ± 0,63	2,74 ± 0,40
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J27 / +</i>		8,51 ± 0,57	2,35 ± 0,36
<i>hop tum-l / X ; cdc2 Df(2L)J77 / +</i>		7,68 ± 0,63	1,98 ± 0,32
<i>stg AR2 / +</i>		4,76 ± 0,46	0,00
<i>stg 7M53 / +</i>		4,83 ± 0,48	0,00
<i>hop tum-l / X ; stg AR2 / +</i>		10,99 ± 0,85	3,72 ± 0,30
<i>hop tum-l / X ; stg 7M53 / +</i>		10,48 ± 0,88	3,67 ± 0,32

**Tabelle 7. Daten der ermittelten Hämozyten-Anzahl aus der Hämolymphe von *Drosophila* Larven.** Genotypen wurden nach den unter Kapitel 2.5.1. angegebenen Kreuzungsschemen hergestellt und laut Angaben unter Kapitel 4.14.7. ermittelt. Pla. =Plasmatozyten; Lam. =Lamellozyten; Stabw =Standardabweichung;  $\bar{x}$  = Mittelwert. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.2..



**Abbildung 22. Grafische Darstellung der ermittelten Hämozyten-Anzahl aus der Hämolymphe von *Drosophila* Larven.** Die grafisch dargestellten Werte wurden der Tabelle 7 entnommen. Blaue Balken repräsentieren die Anzahl der Plasmatozyten x10<sup>6</sup>/ml; Rote Balken repräsentieren die Anzahl der Lamellozyten x10<sup>6</sup>/ml. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Messwerte wider. Untersuchte Genotypen sind unter den Balken aufgeführt. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.2..

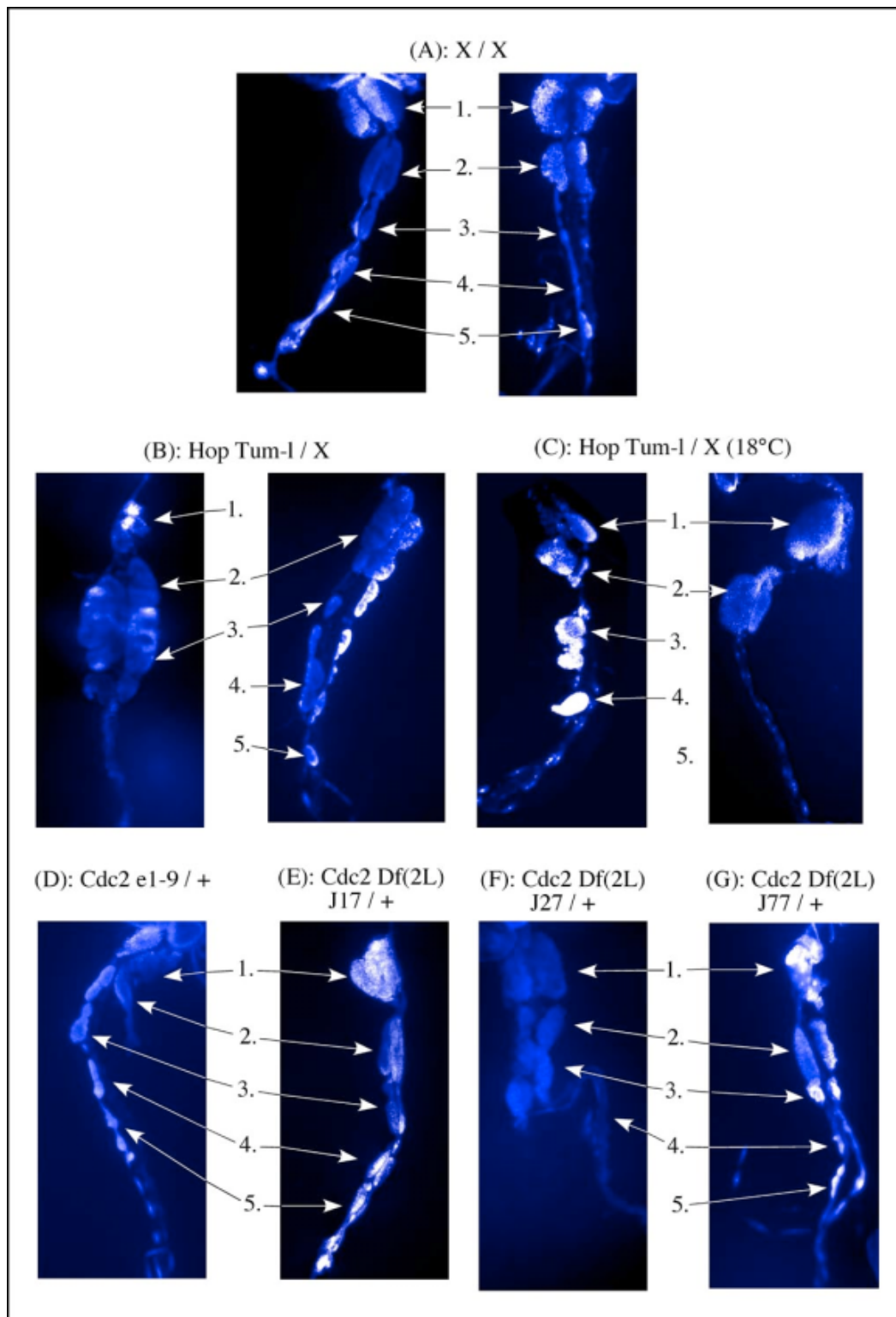
### 2.5.3. *Cdc2* Mutanten supprimieren den *hop*<sup>Tum-l</sup> Lymphdrüsen-Phänotyp *in vivo*

*Hop*<sup>Tum-l</sup> Larven besitzen aufgrund der massiven Überproliferation der Hämocyten eine vergrößerte Lymphdrüse. Dabei ist vor allem das anteriore Gewebepaar stark vergrößert, da hier die überwiegende Proliferation der Blutzellen stattfindet. Neben der starken Vergrößerung der lymphalen Gewebepaare kann ein Platzen der anterioren Lymphdrüsenpaare zur Zerstörung des larvalen Lymphdrüsengewebes führen. Um zu bestätigen, dass *Cdc2* an der Hämatopoese beteiligt ist, wurde untersucht, ob eine *cdc2* Mutation die Vergrößerung der Lymphdrüsen in *hop*<sup>Tum-l</sup> Larven unterdrücken kann. Aus der Suppression des *hop*<sup>Tum-l</sup> Blutzell-Phänotyps durch *cdc2* Mutanten kann geschlossen werden, dass die Vergrößerung der Lymphdrüsen ebenfalls supprimiert werden kann.

Dazu wurden die Lymphdrüsen der unter Punkt 2.5.1. beschriebenen Larven untersucht. Nachdem sie entsprechend ihres Genotyps mittels eines Fluoreszenz-Binokulars sortiert und die Weibchen von den Männchen getrennt wurden (4.14.5.), wurden die Lymphdrüsen isoliert, fixiert und danach mit DAPI gefärbt und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops dokumentiert (4.14.8.).

Die bei 23°C gehaltenen Wildtyp Larven zeigen eine normal entwickelte Lymphdrüse (Abbildung 23A). Es sind in beiden Präparaten die fünf paarig angeordneten Gewebepaare der Lymphdrüse zu erkennen (die Zahl 1 kennzeichnet das anteriore Gewebepaar, die posterioren Gewebepaare wurden von 2 bis 5 durchnummeriert). Das größte Gewebepaar liegt anterior, die kleineren Gewebepaare schließen sich posterior an (Abbildung 23A). Je nach Entwicklung der Larve kann es zu geringen Größenunterschiede der Gewebepaare kommen.

Heterozygote *hop*<sup>Tum-l</sup> Larven des dritten Entwicklungsstadiums dagegen zeigen sowohl bei 18°C als auch bei 23°C deutliche Veränderungen der Lymphdrüse. In Larven, die bei 18°C gehalten wurden, ist bei der Mehrzahl der Präparate das erste anteriore Gewebepaar noch zu erkennen (Abbildung 23C, rechts). Der linke Teil des Gewebepaares ist in seiner Struktur noch erhalten. Dagegen ist der rechte Teil durch die massive Überproliferation der Hämocyten bereits geplatzt. Das zweite Gewebepaar ist ebenso stark vergrößert, die hinteren Gewebepaare fehlen ganz. Bei dem zweiten Präparat (Abbildung 23C, links) ist das anteriore Gewebepaar nicht mehr vorhanden, die hinteren Paare sind verdickt und fehlen jeweils einseitig.



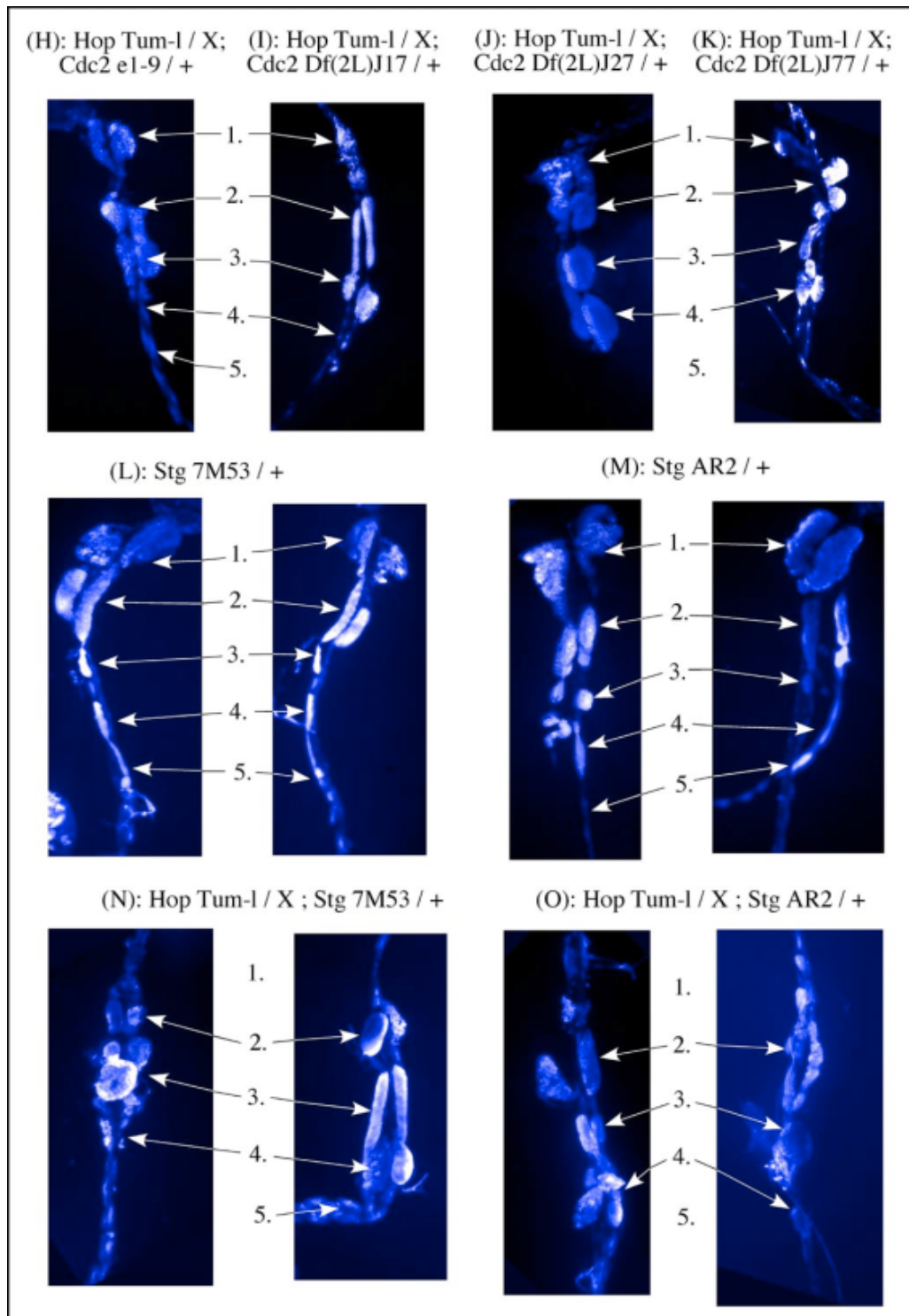
**Abbildungen 23A bis 23G. Präparationen von larvalen Lymphdrüsen des dritten Entwicklungsstadiums.** (A) Wildtyp Larven, (B und C) heterozygote *hop<sup>Tum-1</sup>* Larven, (D) heterozygote *cdc2<sup>e1-9</sup>* Larve, (E) heterozygote *cdc2 Df(2L)J17* Larve, (F) heterozygote *cdc2 Df(2L)J27* Larve, (G) heterozygote *cdc2 Df(2L)J77* Larve. Die Lymphdrüsen wurden freigelegt, fixiert, DAPI-gefärbt und dokumentiert. Der analysierte Genotyp ist über den Abbildungen angegeben. DAPI-Färbung ist in Blau gezeigt. Das anteriore Gewebepaar ist der Nummer 1 zugeordnet. Die posterioren Gewebepaare werden von 2 bis 5 durchnummeriert, falls sie vorhanden sind. Anterior ist oben, posterior unten. Aufzucht-Temperatur, wenn nicht anderst angegeben, betrug 23°C. X = X-Chromosom, + = Wildtyp-Allel. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.3..

Der Lymphdrüsen-Phänotyp der *hop<sup>Tum-1</sup>* Larve ist bei 23°C deutlich ausgeprägter, als bei Larven, die bei 18°C inkubiert werden. Bei allen Präparaten sind keine erhaltenen anterioren Gewebepaare zu erkennen (Abbildung 23D). Falls die ersten Gewebepaare noch zu erkennen sind, sind lediglich Reste der defekten Drüsen zu finden. Im Vergleich zu den Wildtyp Lymphdrüsen sind die zweiten posterioren Gewebepaare immer stark vergrößert und erhalten eine erhöhte Anzahl von Hämocyten. Die hinteren dritten bis fünften Gewebepaare können ebenfalls stark vergrößert sein, oder sie sind beschädigt und fehlen einseitig, oder beidseitig.

Alle *cdc2* Mutanten zeigen eine normal entwickelte Lymphdrüse des dritten larvalen Entwicklungsstadiums (Abbildungen 23D - 23G). Alle fünf paarig angeordneten Gewebepaare sind durch die Präparationen frei gelegt worden. Dabei ist gut zu erkennen, dass das erste anteriore Gewebepaar deutlich größer als die folgenden posterioren Gewebepaare ist. Bei der Präparation der heterozygoten *cdc2<sup>e1-9</sup>/+* Lymphdrüse ist der linke Strang unterhalb des zweiten Gewebepaars abgerissen und konnte nicht dokumentiert werden (Abbildung 23D). Das Fehlen der dritten bis fünften Gewebedrüsen ist also nicht aufgrund der heterozygoten Mutation entstanden, sondern erst durch die Präparation verursacht worden. Die Ausprägungen der dritten bis fünften Gewebedrüsen sind die des rechten Lymphdrüsen Strangs vergleichbar.

Die heterozygoten *hop<sup>Tum-1</sup>/X;cdc2/+* Doppelmutanten zeigen, dass *cdc2* Mutationen den *hop<sup>Tum-1</sup>* Lymphdrüsen Phänotyp supprimieren (Abbildungen 23H - 23K). Bei dem *hop<sup>Tum-1</sup>/X;cdc2<sup>e1-9</sup>/+* Genotyp ist eindeutig zu erkennen, dass die Lymphdrüse nicht so stark vergrößert ist, wie in *hop<sup>Tum-1</sup>/X* Larven (Abbildung 23B, 23C). Es ist zu beobachten, dass das anteriore Gewebepaar vorhanden ist und nicht durch die Überproliferation der Hämocyten zerstört wurde (Abbildung 23H). Weiterhin weisen die Gewebepaare zwei bis fünf eine Wildtyp-artige Morphologie auf, was wiederum auf eine Suppression des *hop<sup>Tum-1</sup>* Lymphdrüsen Phänotyps durch *cdc2* Mutanten schließen lässt.

Durch Kreuzung der *cdc2*-defizitären Fliegenstämme mit *hop<sup>Tum-1</sup>* Fliegen kann man anhand der Lymphdrüsen-Morphologie sehen, dass auch die heterozygote Defizienz von Cdc2 zur Suppression der Überproliferation der Hämocyten führt (Abbildung 23I - 23K).



**Abbildungen 23H bis 23O. Präparationen von larvalen Lymphdrüsen des dritten Entwicklungsstadiums.** (H) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;cdc2<sup>e1-9</sup>/+* Larve, (I) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;cdc2 Df(2L)J17/+* Larve, (J) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;cdc2 Df(2L)J27/+* Larve, (K) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;cdc2 Df(2L)J77/+* Larve, (L) heterozygote *stg<sup>7M53</sup>* Larven, (M) heterozygote *stg<sup>AR2</sup>* Larven, (N) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;stg<sup>7M53</sup>/+* Larven, (O) doppelt-heterozygote *hop<sup>Tum-I</sup>/X;stg<sup>AR2</sup>/+* Larven. Die Lymphdrüsen wurden freigelegt, fixiert, DAPI-gefärbt und dokumentiert. Der analysierte Genotyp ist über den Abbildungen angegeben. DAPI-Färbung ist in Blau gezeigt. Das anteriore Gewebepaar ist der Nummer 1 zugeordnet. Die posterioren Gewebepaare werden von 2 bis 5 durchnummeriert, falls sie vorhanden sind. Anterior ist oben, posterior unten. Aufzucht-Temperatur betrug 23°C. X = X-Chromosom, + = Wildtyp-Allel. Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 2.5.3..

Im Vergleich zu der *cdc2<sup>el-9</sup>* Mutante, die durch einen Aminosäureaustausch ein inaktives Cdc2 Genprodukt exprimiert, zeigen die Lymphdrüsen des *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2 Df(2L)J17/+* Genotyps, die durch eine Teildeletion des 2. Chromosoms kein Cdc2 Genprodukt exprimiert, sehr schmal entwickelte posteriorer Gewebepaare. Obwohl das anteriore Gewebepaar überwachsen und zerstört zu sein scheint, ist eine Suppression in den posterioren Gewebedrüsen eindeutig zu erkennen (Abbildung 23I). Des weiteren sind alle Gewebepaare paarig entwickelt worden.

Nach Präparation der *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2 Df(2L)J27/+* Lymphdrüsen ist zu beobachten, dass die ersten drei Gewebepaare vorhanden und normal entwickelt sind (Abbildung 23J). Die hinteren Gewebepaare gingen durch die Präparation verloren und konnten daher nicht dokumentiert werden. Bei den Lymphdrüsen des *hop<sup>Tum-l</sup>/X;cdc2 Df(2L)J77/+* Genotyps stellt sich die Situation so dar, dass zwar nicht alle Gewebedrüsen paarig vorhanden sind, jedoch ein Teil des anterioren Gewebepaars präsent ist und die posterioren Gewebepaare nicht durch Überproliferation der Hämocyten zerstört sind. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte Cdc2-spezifisch sind und nicht auf Zellzyklusdefekte beruhen, wurden Lymphdrüsen von *string* Mutanten als Negativkontrollen präpariert und auf die Suppression des *hop<sup>Tum-l</sup>* Lymphdrüsen Phänotyps hin untersucht.

Die heterozygoten *string* Mutanten *stg<sup>7M53</sup>* und *stg<sup>AR2</sup>* weisen eine Lymphdrüse auf, die mit der von Wildtyp Larven des dritten Entwicklungsstadiums identisch ist. Alle fünf Gewebepaare sind ausgebildet, die anterioren Paare sind normal ausgebildet und deutlich größer als die posterioren Lymphdrüsenpaare.

Durch Kreuzung der *string*-mutanten Fliegenstämme mit *hop<sup>Tum-l</sup>* Fliegen kann man anhand der Lymphdrüsen-Morphologie sehen, dass kein Einfluss des *string* Genprodukts auf die Überproliferation der Hämocyten und die Differenzierung der Lamellozyten besteht (Abbildungen 23N - 23O). Sowohl nach Präparation der *hop<sup>Tum-l</sup>/X;stg<sup>7M53</sup>/+* als auch der *hop<sup>Tum-l</sup>/X;stg<sup>AR2</sup>/+* Lymphdrüsen ist zu beobachten, dass das erste anteriore Gewebepaar immer fehlt. Zudem sind die posterioren Gewebepaare verdickt, was auf eine Überproliferation der Blutzellen schließen lässt. Die Gewebepaare zwei bis fünf (falls sie vorhanden sind) sind zum Teil nur einseitig präsent. Da diese Phänotypen dem *hop<sup>Tum-l</sup>* Phänotyp vergleichbar sind, findet keine Suppression durch *string* Mutanten statt.



### 3. Diskussion

Die Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade steuert in einer Vielzahl von Organismen essentielle zelluläre Abläufe, wie Zelldifferenzierung oder Embryonalentwicklung (Yeh und Pellegrini, 1999; Imada und Leonard, 2000; Zeidler *et al.*, 2000; Luo und Dearolf, 2001; Castelli-Gair Hombria und Brown, 2002; Hou *et al.*, 2002; O'Shea *et al.*, 2002). Geninaktivierungsstudien der Jak-Gene der Maus sowie Untersuchungen konstitutiv aktiver Jak-Mutanten in *Drosophila melanogaster* zeigen, dass Janus-Kinasen eine überaus wichtige Bedeutung bei der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen haben (Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997; Dearolf, 1998). Obwohl neben der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade auch die Beteiligung der Ras/Raf/MAPK- und Toll/Cactus-Signaltransduktionswege an der Hämatopoese in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden konnte, geben die Analysen konstitutiv aktiver Jak-Mutanten in *Drosophila melanogaster* Anlass zur Vermutung, dass Jaks die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen nicht durch Aktivierung und Phosphorylierung ihres primären Zielfaktors Stat, sondern über die Aktivierung anderer Faktoren regulieren (Qiu *et al.*, 1998; Asha *et al.*, 2003).

Um diese Hypothese zu bestärken, sollten im Rahmen dieser Arbeit bislang unentdeckte Faktoren identifiziert und charakterisiert werden, die durch eine funktionelle Interaktion mit der *Drosophila* Janus-Kinase Hopscotch (Hop) die Proliferation und Differenzierung der Hämocyten steuern. Anhand eines Protein-Protein-Interaktionsnachweises mittels Yeast-Two-Hybrid-Screen sollten *in vivo* Interaktionspartner von Hop aufgedeckt werden, deren Identität, Funktion und enzymatische Aktivität Rückschlüsse auf die Vernetzung der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade mit anderen Signaltransduktionswegen oder von Hop mit weiteren unbekannten Faktoren zulassen.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit insgesamt 21 neue potentielle Interaktionspartner von Hop identifiziert werden. Diese weisen darauf hin, dass Hop mit Komponenten anderer Signaltransduktionskaskaden in Kontakt steht und dass die Regulation der humanen Jaks durch Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteine ebenso in *Drosophila melanogaster* erfolgt (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997).

Weiterhin konnte eine Interaktion der *Drosophila melanogaster* Janus-Kinase Hopscotch mit Cdc2 gezeigt werden. Cdc2 interagiert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit Hop und wird von dieser Kinase in einem *in vitro* Versuchssystem phosphoryliert. *In vivo* Studien haben belegt, dass inaktive *cdc2*-Mutanten den Blutzell-Phänotyp der Hyperproliferation und Differenzierung zu Lamellozyten, welche durch die konstitutiv aktive Punktmutante *hop<sup>Tum-1</sup>* verursacht wird, supprimieren können. Diese Forschungsarbeiten stellen erstmals die direkte Verknüpfungen einer Janus-Kinase mit einer Komponente des Zellzyklus dar, wodurch ein neuer Regulationsansatz des Zellzyklus und die daraus folgende Blutzell-Pro-  
liferation entsteht.

### 3.1. Funktionelle Hop-Interaktion mit Cdc2

Eine funktionelle Interaktion von Hop und Cdc2, welche zur Phosphorylierung von Cdc2 führt, wurde durch Kinase-Assays erbracht (Abbildung 19 und 20). Dabei wurden Hop, Hop<sup>Tum-1</sup> und verschiedene Hop Mutanten mit Cdc2 inkubiert, um deren Phosphorylierungsverhalten bezüglich Cdc2 beobachten zu können. Die generierten und als inaktiv postulierten Hop Punktmutanten zeigen in den Kinase-Assays sowohl Auto- als auch Transkinaseaktivität. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Auswahl der generierten Punktmutanten. Obwohl Aminosäuren mutiert wurden, die Kinaseaktivität von humanen Jaks ausschalten, können durch eine unterschiedliche Molekülstruktur die Aminosäuren unterschiedliche Aufgaben innerhalb der humanen und *Drosophila* Jaks übernehmen.

Im Vergleich zu Hop und Hop<sup>Tum-1</sup> zeigt sich, dass das Deletionsprotein Hop $\Delta$ C bei identischen Proteinmengen keine Phosphorylierung von Cdc2 vermitteln kann (Abbildung 20A). Sowohl Wildtyp Hop als auch Hop<sup>Tum-1</sup> zeigen eine annähernd gleiche Auto- und Transkinase-Aktivität. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Hop<sup>Tum-1</sup> eine konstitutiv aktive, aber nicht hyperaktive Mutante ist. In Zellkultur-Experimenten wurde zwar nachgewiesen, dass Hop<sup>Tum-1</sup> im Vergleich zu Wildtyp Hop stärker phosphoryliert ist, doch dies ist in einem zellfreien Versuchssystem nicht zu beobachten (Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis könnte in der fehlenden Rezeptorbindung der Proteine begründet sein. Die in der Zellkultur überexprimierten Kinasen könnten eine unterschiedliche Kinase-Aktivität aufweisen, da sie an Rezeptoren gebunden sind und somit Konformationsänderungen erfahren, die die Kinaseaktivität erhöhen.

Die bei den durchgeführten Zellkultur-Experimenten scheinbar sehr wichtige Rezeptorbindung kommt bei den gezeigten Kinase-Assays nicht zum tragen, wodurch Hop und Hop<sup>Tum-l</sup> als gleichwertig aktive Enzyme angesehen werden können.

Die durch Autoradiografie sichtbar gemachten phosphorylierten Proteine zeigen auf Höhe von Hop stets eine Doppelbande. Dabei repräsentiert die untere Bande Hop und die obere ein Protein, welches unspezifisch parallel mit der Hop Reinigung aus eukaryotischem Ganzzellextrakt gereinigt wurde. Dieses unspezifische Protein ist auch dann zu erkennen, wenn der Kinase-Assays mit dem katalytisch inaktiven Hop $\Delta$ C durchgeführt wurde. Durch massenspektrometrische Analysen dieser Banden (Daten nicht gezeigt) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der oberen Bande nicht um ein durch den eukaryotischen *Sf9* Ganzzellextrakt modifiziertes Hop-Protein handelt. Ebenfalls massenspektrometrisch analysiert wurde die unspezifische Bande auf dem Western-Blot (Abbildung 20B) in der Hop $\Delta$ C Spur, welche etwas unterhalb der Hop Banden läuft. Auch hierbei handelt es sich nicht um ein Hop Protein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die spezifische Phosphorylierung von Cdc2 in diesen Assays durch Hop erfolgt. Im Vergleich zu dem Hop $\Delta$ C Protein, welches keine Kinase- und Kinase-ähnliche-Domäne mehr enthält, zeigen Hop und Hop<sup>Tum-l</sup> deutliche Cdc2-Transkinase-Aktivität. Als weitere Möglichkeit müsste diskutiert werden, ob diese vermittelte Phosphorylierung tatsächlich von den Hop-Kinasen hervorgerufen wird, oder von einer unspezifischen Kinase in dem benutzten Versuchssystem. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusammen mit den Hop-Proteinen eine unspezifische Kinase aus dem *Sf9* Ganzzellextrakt gereinigt wurden, welche am COOH-Terminus mit Hop assoziiert ist. Hält man diesen eher unwahrscheinlichen Sachverhalt für möglich, würde diese Kinase nicht an Hop $\Delta$ C binden können und wäre dadurch in den Kinase-Assays nicht präsent. Um die Vermutung zu unterstützen, dass Hop Cdc2 spezifisch modifiziert, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

### 3.1.1. Mögliche Phosphorylierungs-Modifizierungen von Cdc2 durch Hop

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass inaktive Cdc2 Mutanten den Blutzell-spezifischen *hop*<sup>Tum-1</sup> Phänotyp supprimieren können (2.5.). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die temperatur-sensitive konstitutiv aktive Kinase Hop<sup>Tum-1</sup> Cdc2 phosphoryliert und so die Regulation der Proliferation und Differenzierung der Hämocyten beeinflusst. Dadurch stellt sich die Frage, an welchem Tyrosin-Rest Cdc2 durch Hop modifiziert wird, um eine Aktivierung von Cdc2 zu erreichen. Bis dato sind lediglich 3 Modifizierungen von Cdc2 durch Phosphorylierungen bekannt, welche zur Regulation dieser Kinase und damit des Zellzyklus führen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des CyclinB1/Cdc2 Komplexes von seiner zellulären Lokalisation beeinflusst wird (Hagting *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Wenn die Expression von Cyclin B1 in der späten S-Phase erhöht wird, findet die Bildung des CyclinB1/Cdc2 Komplexes statt und dieser akkumuliert im Zytoplasma. In diesem Zustand finden die bekannten 3 Modifizierungen statt. Die Kinasen der Wee1/Myt1-Familie phosphorylieren Cdc2 an Threonin 14 und Tyrosin 15. Diese Modifizierungen finden bereits im Zytoplasma statt und befinden sich innerhalb der ATP-Bindungsdomäne. Somit wird die Bindung von ATP an Cdc2 blockiert und das Enzym ist in diesem Stadium inaktiv (Gould und Nurse, 1989; Krek und Nigg, 1991; Norbury *et al.*, 1991).

Die einzig bekannte aktivierende Phosphorylierung wird durch eine Cdk-aktivierende Kinase (CAK) katalysiert. Im Falle von Cdc2 setzt sich die CAK aus einem trimeren Komplex aus CyclinH/Cdk7/Mat1 zusammen und phosphoryliert Cdc2 an Threonin 161. Diese Phosphorylierung wird zur vollständigen Aktivität des CyclinB1/Cdc2 Komplexes benötigt und findet im sogenannten T-Loop von Cdc2 statt, welcher sich räumlich benachbart zur Cdc2 Kinase-Domäne befindet (Fisher und Morgan, 1994; Makela *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Threonin 161 erst nach Import des CyclinB1/Cdc2 Komplexes in den Zellkern durch CAK gesetzt wird.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass im Zytoplasma, wo die funktionelle Interaktion von Hop und Cdc2 stattfinden muss, keine aktivierende Phosphorylierung von Cdc2 bekannt ist.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz von Cdc2 und analysiert die Positionen von Threoninen und Tyrosinen, so läßt sich erkennen, dass insgesamt 12 Tyrosine und 13 Threonine enthalten sind und es zwei Positionen gibt, an denen diese zwei Aminosäuren

benachbart vorkommen. Zum einen sind das die Positionen Threonin 14/Tyrosin 15, welche durch Phosphorylierung zur Inaktivität des Enzyms führen. Zum anderen liegen Tyrosin 160/Threonin 161 direkt neben einander, wobei der aktivierende Effekt der Threonin 161 Modifizierung nachgewiesen wurde (Solomon, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995; Morgan, 1995). Die zusätzliche Phosphorylierung der Aminosäuren Tyrosin 160 oder Tyrosin 169 wären weiterhin denkbare Modifizierungen, da sie im T-Loop von Cdc2 lokalisiert sind und deswegen positive regulatorische Auswirkungen auf Cdc2 oder auf einen Cyclin/Cdc2 Komplex haben könnten.

### 3.1.2. Funktion und Auswirkung der Hop-vermittelten Cdc2-Phosphorylierung auf den Zellzyklus

Durch Kreuzung von heterozygoten *hop<sup>Tum-l</sup>* Fliegen mit heterozygoten *cdc2* Fliegen, die ein inaktives *cdc2* Genprodukt exprimieren, konnte nachgewiesen werden, dass der Blutzell-Phänotyp der *hop<sup>Tum-l</sup>* Fliegen in der Larve supprimiert werden kann (2.5.). Präparationen der Blutzellen und der Lymphdrüsen lieferten Anhaltspunkte für diese Annahme (Abbildungen 21 und 23). Durch eine quantitative Analyse konnte bestätigt werden, dass die Überproliferation der Hämocyten und die Differenzierung der Lamellocyten signifikant supprimiert werden kann (2.5.2.).

Da der *hop<sup>Tum-l</sup>* Phänotyp offensichtlich die Proliferation von Zellen beeinflusst, kann angenommen werden, dass Hop die Regulation des Zellzyklus beeinflussen kann. In der Wildtyp Situation führt dies zu einer „normalen“ Regulation des Zellzyklus, so dass es zu keiner vermehrten Bildung von Blutzellen kommt. Im Falle der temperatur-sensitiven konstitutiv aktiven Janus-Kinase Hop<sup>Tum-l</sup> bedingt dies hingegen die Verschiebung der Kontrollmechanismen des Zellzyklus. Komponenten, in unserem konkreten Fall Cdc2, könnten beeinflusst und das Gleichgewicht der am Zellzyklus beteiligten Proteine verschoben werden. Durch die Phosphorylierung von Cdc2 durch Hop könnten die Regulationsmechanismen der G2-Phase verschoben und dadurch der Eintritt in die M-Phase forciert werden. Durch anhaltende Signale zum Eintritt in die M-Phase könnte Hop in der Mutante eine Überproliferation der Blutzellen bewirken.

Dadurch stellt sich die Frage, welches die Funktion der Phosphorylierung von Cdc2 durch Hop<sup>Tum-l</sup> bzw. die Phosphorylierung von Cdc2 in der Wildtyp-Situation ist.

Eindeutig belegt wurde die Beobachtung, dass die Phosphorylierung von Threonin 160 in Cdk2 im T-Loop und die Phosphorylierung von Threonin 161 im T-Loop von Cdc2 die katalytische Aktivität dieser Proteine um das 300-fache steigern kann und darüber hinaus die Assoziation mit ihren zugehörigen Cyclinen stabilisiert (Russo *et al.*, 1996). Die Threonin 161 Phosphorylierung stabilisiert desweiteren die Stabilität des CyclinA/Cdc2 Komplexes (Ducommun *et al.*, 1991; Desai *et al.*, 1995; Larochelle *et al.*, 1998).

Für die Cyclin-abhängige Kinase 7 (CDK7) konnte nachgewiesen werden, dass eine zweite Phosphorylierung im T-Loop zur Stabilisierung dieses Proteins innerhalb des CAK Komplexes beiträgt und die Aktivität der Kinase beeinflusst (Martinez *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 2001; Larochelle *et al.*, 2001). Die Bildung eines aktiven CAK Komplexes, welcher aus Cdk7, Cyclin H und Mat1 zusammengesetzt ist, erfordert dagegen nicht die Phosphorylierung von Cdk7 (Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Phosphorylierung des T-Loop wichtig für die Aktivität und Stabilität einer Cyclin-abhängigen Kinase ist. Obwohl nur die duale Phosphorylierung von Cdk7 im T-Loop bekannt ist, könnte die Modifizierung durchaus in anderen Cdks auftreten und die Stabilität dieser Proteine und/oder die Assoziation der Cdks mit Cyclinen verstärken.

Im Falle von Cdc2 erscheint eine Phosphorylierung durch Hop an Tyrosin 160 oder Tyrosin 169 möglich. Stabilisierte und aktivierte Cdc2 Moleküle könnten eine höhere Affinität zu Cyclin B besitzen und dadurch den Übergang des Zellzyklus von der G2- in die M-Phase bewirken. Die Tatsache, dass Cdks immer von anderen Kinasen im T-Loop phosphoryliert werden und sich nicht selbst an diesen Positionen modifizieren können, unterstreicht das Ergebnis, dass Hop Cdc2 phosphoryliert.

Analysiert man weiterhin die Bindungs- und Aktivitätseigenschaften des Cdk7-Cyclin H-Mat1 Komplexes, so kann man erkennen, dass das Erreichen der vollständigen Aktivität des trimeren Komplexes dadurch umgangen werden kann, dass Cdk7 an Serin 164 und Threonin170 phosphoryliert ist. Sobald die duale Phosphorylierung *in vitro* etabliert ist, ist Mat1 für die vollständige Cdk7-CyclinH-Aktivität nicht mehr notwendig (Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995, Tassan *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 1997; Garrett *et al.*, 2001). Wendet man diese Aussage auf Cdc2 an, so könnte es möglich sein, dass durch eine duale Phosphorylierung des T-Loop die Bindung eines weiteren Faktors an den CyclinB/Cdc2 Komplex nicht unbedingt erfolgen muss, um weitere Substrate phosphorylieren zu können. Denkbar wäre dabei auch die verstärkte Translokation dieses Komplexes in den Zellkern und dadurch eine Beschleunigung des G2/M-Übergangs des Zellzyklus. Spekulieren läßt

sich unter anderem, ob diese duale Modifizierung durch Phosphatgruppen die Substratspezifität von Cdc2 schon in Zytosol verändern und dadurch verstärkt zytosolische Proteine beeinflusst werden, die die Proliferation und Differenzierung der Hämozyten regulieren.

Die Beeinflussung der Lokalisation von Cdc2 oder des Cyclin/Cdc2 Komplexes wäre ein weiteres Mittel, Kontrolle auf den Zellzyklus und auf die Proliferation und Differenzierung der Hämozyten auszuüben. Die Bedeutung für die Komplexe zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu sein, wurde dadurch gezeigt, dass die Aktivität des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes *in vivo* von seiner zellulären Lokalisation abhängt (Hagting *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Zum heutigen Zeitpunkt wird angenommen, dass die einzig aktivierende Phosphorylierung von Threonin 161 an Cdc2 im Zellkern durch ein CAK Enzym erfolgt, wodurch zuvor der Transport des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes in den Zellkern erfolgen muss. Da weder Cdc2 noch Cyclin B1 eine NLS-Sequenz (Nuclear localization signal) aufweisen, wird vermutet, dass ein weiterer Faktor an die beiden Proteine bindet und deren Import in den Zellkern ermöglicht (Kong *et al.*, 2000). Hop könnte somit durch Phosphorylierung eines Tyrosinrests ein Signal für die Bindung eines solchen Faktors setzen. Dabei wäre auch die Modifizierung eines Tyrosinrestes außerhalb des T-Loop denkbar, um die Assoziation eines Proteins mit einer NLS-Sequenz zu erreichen.

Ebenfalls denkbar wäre, dass die Hop-vermittelte Modifizierung von Cdc2 die Bindung eines Faktors hemmt, welcher die zytoplasmatische Lokalisation von Cdc2 bewirkt. Solch einen Faktor stellt Myt1 dar. Es wurde gezeigt, dass die direkte Interaktion von Cdc2 und Myt1 im Zytoplasma dazu beiträgt, die Balance der Cdc2 Lokalisation auf die Seite des Zytoplasmas zu verschieben (Liu *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999). Durch Phosphorylierung einer alternativen Modifizierungsstelle könnte der Zugang von Myt1 an Cdc2 erschwert werden. Ausserdem ist es möglich, dass die Phosphorylierung die Struktur von Cdc2 derart verändert, dass Myt1 sein natives Substrat nicht mehr erkennen kann und daraufhin durch Beeinflussung des Gleichgewichts mehr Cdc2 in den Zellkern transportiert wird.

Betrachtet man die Interaktion von Hop und Cdc2 im Kontext des Zellzyklus und bringt weitere Faktoren in das Zusammenspiel dieser beiden Proteine, so könnte in Erwägung gezogen werden, ob Hop Cdc2 als einziges Substrat in diesem Szenario phosphoryliert,

oder weitere Proteine des Zellzyklus. Als interessante Möglichkeit wäre hierzu die Manipulation des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes oder nur von Cyclin B1 zu nennen. Untersuchungen haben ergeben, dass die zytoplasmatische Lokalisierung dieses Komplexes wesentlich von der CRS-Sequenz (cytoplasmatic retention signal) bestimmt wird, welche sich am NH<sub>2</sub>-Terminus von Cyclin B1 befindet (Pines und Hunter, 1994). Würde durch eine aktivierende Mono- oder Diphosphorylierung von Cdc2 die Bindung an Cyclin B1 verändert, könnte das ferner die Wirkung dieser CRS-Sequenz verändern. Entweder würde das Signal durch eine Konformationsänderung für Faktoren, welche das Verbleiben des Komplexes im Zytoplasma bewirken, unzugänglich, oder die Bedingungen wären für die Bindung von Import-Faktoren des Zellkerns in diesem Falle wesentlich günstiger. Somit wäre wiederum das Gleichgewicht des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes auf die Seite des Zellkerns verschoben worden und es könnte ein Übergang der G2- in die M-Phase eingeleitet werden.

Diese aktivierenden Signale könnten dabei zum Beispiel die aktivierenden Signale durch die Dephosphorylierung von Cdc2 durch Cdc25B imitieren oder sogar dominieren, die nach dem heutigen Stand der Forschung „das“ Signal für den Import in den Zellkern darstellen sollen. Dabei sollte nicht unerwähnt bleiben, dass ebenfalls durch eine Phosphorylierung der CRS-Sequenz von Cyclin B1 die Lokalisation des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes reguliert wird. Durch die Modifizierung dieser Sequenz durch eine Phosphatgruppe werden die Aktivitäten für den Kernimport erhöht und gleichzeitig die Vorgänge des Kernexports gehemmt (Pines und Hunter, 1991; Li *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001). Kinasen, die die Phosphorylierung der CRS-Sequenz von Cyclin B1 bewerkstelligen können, sind nicht bekannt. Ein funktionelles Zusammenspiel von Hop mit Cyclin B1 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, doch wäre dies ein weiterer überaus interessanter Ansatz, wie Janus-Kinasen den Zellzyklus und die Proliferation und Differenzierung der Hämocyten regulieren können.

Betrachtet man nochmals die stabilisierende und modifizierte Wirkung einer zusätzlichen Phosphorylierung von Cdc2 im T-Loop durch Hop, so könnte dies auch Auswirkungen auf die Bindung der CKI Proteine (CDK inhibitors) haben. CKI Proteine sind kleine, inhibitorisch wirkende Moleküle, die sowohl mit dem NH<sub>2</sub>-terminalen Ende von Cdks, als auch mit der Cyclin Untereinheit interagieren können (Pines, 1994; Chen *et al.*, 1996). Durch diese Interaktion inhibieren sie die Cyclin-gebundenen Cdks, indem sie die korrekte Faltung der katalytischen Domäne der Kinase verhindern. Weiterhin stören sie das durch



CAK Proteine gesetzte aktivierende Signal der Threonin 161 Phosphorylierung (Morgan, 1997). Betrachtet man diesen Weg der Regulation, so könnte die Phosphorylierung von Cdc2 durch Hop eine Alternative darstellen, wie die Hemmung von Cdc2 durch CKI Proteine umgangen und ein Übergang von der G2- in die M-Phase erreicht werden könnte. Durch Aktivierung von Hop könnte eine alternative Phosphorylierungsstelle modifiziert sein, wodurch Cdc2 trotzdem aktiviert, aber für CKI Proteine unzugänglich gemacht wird. Damit würde man auch die Notwendigkeit der Threonin 161 Phosphorylierung umgehen. Hop aktiviertes Cdc2 müsste an Threonin 161 nicht phosphoryliert sein, um aktiv zu werden und eine negative Regulation durch CKI Proteine würde in diesem Fall nicht stattfinden. Diese Art der Kontrolle, bei der externe Signale durch die Janus-Kinase zu einer Zellteilung führen, könnte in der Wildtyp Situation auftreten, wenn es um schnelle Zellteilungen geht und dabei einige negative Regulationen umgangen werden müssen. Durch die temperatur-sensitive konstitutiv aktive *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante könnte in bestimmten Entwicklungsstadien diese Umgehung der CKI-Hemmung permanent erfolgen und somit die Hyperproliferation der Blutzellen bewirken.

Bei der Diskussion um die Aushebelung von inhibierenden Mechanismen darf nicht vergessen werden, dass ebenfalls die hemmende Wirkung der Threonin 14 und Tyrosin 15 Phosphorylierung, welche durch die Kinasen Wee1 und Myt1 gesetzt werden, blockiert werden kann. Hop könnte durchaus einen Tyrosinrest außerhalb des T-Loops phosphorylieren und damit die Konformation von Cdc2 ändern. Diese Änderung würde eventuell verhindern, dass die Wee1 und Myt1 Kinasen Zugang zu Cdc2 haben und die hemmenden Modifizierungen bewerkstelligen können. Im Falle der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante würde das wiederum die kontinuierliche Aktivierung von Cdc2 bedeuten.

Ein weiteres Beispiel wodurch belegt wird, dass die Phosphorylierung von Threonin 161 von Cdc2 nicht unbedingt benötigt wird und dass es alternative Aktivierungsmechanismen von Cdc2 gibt, stellt zum Beispiel das Protein RINGO dar (rapid inducer of G2/M progression in oocytes). Es konnte *in vitro* und in *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden, dass der Komplex aus RINGO und Cdc2 die Cyclin-abhängige Kinase aktivieren kann und dadurch die aktivierende Phosphorylierung von Threonin 161 umgangen wird (Karaiskou *et al.*, 2001). Die aktivierende Wirkung von Cdc2 läuft aber in allen Fällen auf das gleiche Prinzip hinaus: es erfolgt immer eine Änderung der T-Loop Struktur und Konformation (Russo *et al.*, 1996; Morgan, 1997), die unter „normalen“ Umständen durch die Phospho-

rylierung von Threonin 161 erreicht wird, aber auch durch alternative Mechanismen erzielt werden könnte

Weitere interessante Forschungsarbeiten an *Xenopus* Oozyten haben belegt, dass ungefähr 90% des Cdc2 nicht mit Cyclinen assoziiert ist und nur ein Teil von diesem monomeren Cdc2 an Threonin 161 phosphoryliert ist (Kobayashi *et al.*, 1991; Ferby *et al.*, 1999). Da es somit eine Mehrheit von monomerem Cdc2 gibt und sich diese Mehrheit noch in phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Proteine aufteilt, könnte somit die Substratspezifität von zwei unterschiedlichen regulatorsich-aktivierenden Mechanismen angesprochen werden. Es könnte tatsächlich durch Stimulation der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade monomeres Cdc2 als Zielfaktor angeregt werden, um den G2/M-Übergang über einen „nicht-klassischen“ Weg zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hop durch Cdc2 auf den Zellzyklus einwirken kann. Ob dies durch Aktivierung von monomerem oder komplexiertem Cdc2 zustande kommt, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. Interessant wäre auch die Klärung der Frage, ob sich durch die Hop-vermittelte alternative Aktivierung von Cdc2 dessen Substrate ändern. Bekannte Substrate des Cyclin B1/Cdc2 Komplexes sind unter anderem nukleare Lamine, kernspezifische Proteine, Proteine der Kernporen oder centrosomale Proteine (Dessev *et al.*, 1991; Peter *et al.*, 1990; Blangy *et al.*, 1995; Keryer *et al.*, 1995; Macaulay *et al.*, 1995; Ookata *et al.*, 1995). Diese Substrate sind ebenso an der Ausführung und der zeitlichen Kontrolle der Mitose beteiligt und würden durch die Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade auf zweiter Ebene beeinflusst werden. Da CyclinB/Cdc2 desweiteren eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation spielt (Long *et al.*, 1998; Papst *et al.*, 1998), könnte ferner im Fall des *hop<sup>Tum-1</sup>* Phänotyps die Expression von Genen, welche bei der Proliferation der Hämozyten und Differenzierung der Lamellozyten beteiligt sind, gesteuert werden.

### 3.2. Funktionelle Hop-Interaktion mit CG2944

Die Identifizierung von CG2944 als Interaktionspartner der *Drosophila melanogaster* Janus-Kinase Hopscotch in einem YTHS unterliegt den selben Schwierigkeiten, die bereits unter Punkt 3.1. für Cdc2 beschrieben wurden. Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass CG2944 in seiner vollständigen Aminosäuresequenz im Zellkern der Hefe alle Gal4-abhängigen Reportergene aktivieren kann (Abbildungen 15 und 16). Darüber hinaus konnte in einem *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsnachweis gezeigt werden, dass Hop und CG2944 in einem zellfreien Versuchssystem interagieren können (Abbildung 17). Aus beiden Versuchen kann geschlossen werden, dass eine mögliche funktionelle Interaktion der beiden Proteine nicht aufgrund des Milieus des Hefezellkerns zustand kommt und weiterhin eine Interaktion der beiden Proteine in Volllänge zu beobachten ist. Daraus könnte abgeleitet werden, dass die Ausbildung der Strukturen der nativen Proteine in Hefe und im *in vitro* Testsystem stattgefunden hat und in beiden Fällen die Interaktion aufgrund der Ausbildung der nativen Konformation stattgefunden hat.

Ferner konnte belegt werden, dass die Gal4-BD und Gal4-AD, welche in Fusion mit den beiden Proteinen exprimiert werden, keinen Einfluss auf die Struktur der Proteine und somit auf dessen Interaktion hatten. Im Gegensatz zum YTHS wurde im *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsnachweis ein Hop-Protein mit N-terminalem Flag-Epitop und C-terminaler Poly-His-Sequenz verwendet. Da CG2944 für den *in vitro* Interaktionsnachweis ohne anhängende Aminosäuresequenz exprimiert wurde und in beiden Interaktionssystemen eine Interaktion zwischen Hop und CG2944 zu beobachten ist, kann angenommen werden, dass durch das Anhängen von zusätzlichen Aminosäuren die Strukturen von Hop und CG2944 nicht beeinträchtigt werden und somit eine nicht existente Interaktion, die in *Drosophila* nicht funktionell wäre, ausgeschlossen werden kann.

Für eine funktionelle Interaktion von Hop und CG2944 spricht die Tatsache, dass humane SOCS Proteine identifiziert sind, welche die humane Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade regulieren und essentielle entwicklungsbiologische Vorgänge haben (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Hilton *et al.*, 1998). Die Regulation von Hop durch CG2944 könnte zum Beispiel durch Hemmung der intrinsischen Kinase-Aktivität durch direkte Bindung der beiden Proteine erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosin-

Phosphorylierung von Jak2 und Stat signifikant durch die Überexpression von SOCS1 reduziert werden konnte, worauf geschlossen werden kann, dass SOCS1 die Tyrosin-Kinase-Aktivität der Janus-Kinase blockiert (Endo *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 1999; Yasukawa *et al.*, 1999). Durch genauere Studien dieser Beobachtung wurde postuliert, dass SOCS1 sofort nach Jak-Autophosphorylierung an den Tyrosinrest 1007 des Jak-Proteins bindet (homologe Aminosäure in Hop ist Tyrosin 1047) und somit die Kinase-Aktivität blockiert, indem im folgenden weitere intra- und intermolekulare Phosphorylierungen durch die Kinase-Domäne unterbunden wird.

Ebenfalls denkbar wäre die Hemmung der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade durch die Präsenz weiterer Substrate, welche das extrazelluläre Signal nicht weiterleiten. SOCS Proteine könnten in diesem Fall ein alternatives Substrat zu Stat darstellen, oder durch eine höhere Affinität zu Jaks die Bindung von Stat an Jak verhindern. Der selbe Effekt würde entstehen, wenn SOCS Proteine durch eine gesteigerte Expression im Vergleich zu Stat in einer größeren Anzahl vorliegen würden. Diese Konkurrenzsituation würde die Bindung von Stat an Jak praktisch unterbinden, was durch erste Versuche nachgewiesen wurde (Yoshimura *et al.*, 1995; Gobert *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1997).

Überraschender weise wurde festgestellt, dass SOCS Mutanten, welche keine C-terminale SOCS Domäne mehr besitzen, immer noch an Jak binden können und dabei auch ihre Fähigkeit bewahren, Cytokin-induzierte Genaktivierung zu blockieren (Narazaki *et al.*, 1998; Nicholson *et al.*, 1999; Yasukawa *et al.*, 1999). Die SOCS Domäne scheint somit zumindest in den verwendeten Überexpressionsstudien nicht für die inhibitorische Wirkung benötigt zu werden. Als die tatsächliche Funktion dieser Domäne wird zum heutigen Standpunkt der Forschung angesehen, dass sie als Vermittler der Ubiquitinierung und somit der SOCS-abhängigen Degradierung von Proteinen dient. Es konnte bestätigt werden, dass mehrere SOCS-Proteine eine Interaktion mit dem Elongin BC Komplex eingehen (Kamura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Elongin BC interagiert des weiteren mit dem Hippel-Lindau (VHL) Tumor-Suppressor-Protein als Bestandteil des VBC Komplexes, welcher wiederum E1- und E2-abhängige Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt (Lisztwan *et al.*, 1999; Iwai *et al.*, 1999). Darauf basierend wurde nachgewiesen, dass der VBC Komplex die Ubiquitinierung von VHL Bindungspartnern *in vitro* vermittelt (Cockman *et al.*, 2000; Kamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000). Diese Anordnung erinnert somit stark an den bekannten SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Skowyra *et al.*,

1997; Yu *et al.*, 1997; Kamura *et al.*, 1999, Skowyra *et al.*, 1999). Elongin BC bindet VHL und mehrere SOCS Proteine durch eine sogenannte BC-box, welche ausserdem auch in der SOCS-Domäne vorkommt und folgende Sequenz aufweist: (T,S,P)(L,M)XXX(C,S)XXX(V,L,I) wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann (Kamura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Wenn man diese Daten in Einklang miteinander bringt, so scheint die SOCS-Domäne als Adapter zu fungieren. Dabei würden SOCS-Proteine ihre Bindungspartner zu einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex rekrutieren, welche infolge dessen ubiquitiniert und für die Degradierung markiert würden.

Übereinstimmend mit dieser Idee, dass Komponenten von Signaltransduktionskaskaden Ziele für einen SOCS-Domäne-vermittelten proteasomalen Abbau sind, sind die Beobachtungen, dass Signale des Jak/Stat-Signaltransduktionswegs durch die Anwesenheit von proteasomalen Inhibitoren aufrecht erhalten werden können (Yu *et al.*, 1997; Verdier *et al.*, 1998). So gibt es konkrete Hinweise darauf, dass die SOCS-Domäne den Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Abbau des Oncoproteins Tel-Jak2 verursacht (Frantsve *et al.*, 2001; Kamizono *et al.*, 2001; Monni *et al.*, 2001).

Ungeklärt bleibt in diesem Kontext auch die Frage, ob Proteine mit einer SOCS-Domäne auch selbst durch diesen Mechanismus durch Ubiquitin markiert und in folge dessen im Proteasom abgebaut werden. Zieht man die Parallelen zwischen der SOCS-vermittelten Degradierung von Proteinen und dem SCF Komplex, so gibt es Vermutungen, dass diese Proteine relativ instabil sind, selbst ubiquitiniert und abgebaut werden. Möglicherweise könnte das durch einen autokatalytischen Mechanismus eines SCF-ähnlichen Komplexes selbst ausgeführt werden (Zhou und Howley, 1998; Mathias *et al.*, 1999; Galan und Peter, 1999). Wäre dies auch im Falle von Hop und CG2944 zutreffend, würde das einen äußerst eleganten Regulationsmechanismus darstellen, wie das Hop-vermittelte Signal zunächst herunterreguliert wird und danach die Zelle für weitere Impulse der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade empfänglich wäre.

Eine funktionelle Interaktion zwischen Hop und CG2944 könnte darüber hinaus von essentieller Bedeutung bei der Proliferation und Differenzierung der Hämozyten in *Drosophila* sein. So konnte mehrfach durch Geninaktivierungsstudien verschiedener SOCS Gene der Maus nachgewiesen werden, dass die humanen SOCS Proteine eine überaus wichtige Rolle bei der T-Zell Entwicklung und Differenzierung spielen. So konnte durch SOCS1-defizitäre Mäuse gezeigt werden, dass SOCS1 für die Differenzierung von CD8<sup>+</sup>

und CD4<sup>+</sup> Zellen unerlässlich ist und außerdem das Verhältnis von CD4 zu CD8 Zellen durch SOCS1 reguliert werden kann (Chong *et al.*, 2003, Cornish *et al.*, 2003; Ilangumaran *et al.*, 2003). Wie SOCS1 ist auch SOCS3 bei der T-Zell Differenzierung beteiligt. SOCS3 wird zum Beispiel ausschließlich in murine T2-Helferzellen exprimiert (Egwuagu *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003). Ferner wurde festgestellt, dass die Expression von SOCS3 in peripheren T2-Helferzellen bei Patienten mit einer T2-Helferzellen-Erkrankung mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Je schwerer die Erkrankung ist, desto höher ist die SOCS3 Expression in den jeweiligen T-Zellen (Seki *et al.*, 2003). Ebenso wurde dabei die Bindung von SOCS3 an die zytoplasmatische Region des IL-12 Rezeptors gezeigt, welcher die IL-12-vermittelte Aktivierung von STAT4 in T-Zellen blockiert.

Die T-Zell Regulation wird weiterhin durch negative Regulation von IL-2 Signalen durch SOCS3 erreicht und durch dessen Hemmung der TCR-und CD28-Signaltransduktionswege (Cohney *et al.*, 1999). Dabei bindet SOCS3 die Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin, was wiederum zur Hemmung der TCR-abhängigen Funktion des Transkriptionsfaktors NFAT führt (Banerjee *et al.*, 2002). Zusätzlich unterbindet die Bindung von SOCS3 an die PI3-Kinase-Bindestelle von CD28 die CD28-vermittelte Produktion von IL-2 (Matsumoto *et al.*, 2003).

Anhand dieser Daten kann vermutet werden, dass CG2944 eine ähnliche Wirkung auf Hop ausübt und somit die Regulation der Proliferation und Differenzierung der Hämocyten in *Drosophila melanogaster* entscheidend beeinflussen kann.

### 3.3. Funktionelle Hop-Interaktion mit CG17033

Nach der Identifizierung von CG17033 als möglichen Interaktionspartner der Janus-Kinase Hopscotch (Jochen Bogin, Diplomarbeit 2000), wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt, um die tatsächliche funktionelle Interaktion weiter charakterisieren zu können (siehe auch 3.1. und 3.2.). In seiner vollständigen Aminosäuresequenz kann CG17033 im Zellkern der Hefe alle Gal4-abhängigen Reportergene aktivieren (Abbildungen 15 und 16). Darüber hinaus konnte in einem *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsnachweis gezeigt werden, dass Hop und CG17033 in einem zellfreien Versuchssystem interagieren können (Abbildung 17). Aus beiden Versuchen kann geschlossen werden, dass eine mögliche funktionelle Interaktion der beiden Proteine nicht aufgrund des Milieus des Hefezellkerns zustand kommt und ferner die Interaktion der beiden Vollängenproteine zu beobachten ist.

Daraus könnte man schließen, dass die Ausbildung der Strukturen der nativen Proteine in Hefe und im *in vitro* Testsystem stattgefunden hat und die Interaktionen aufgrund der nativen funktionellen Konformation besteht. Weiterhin konnte belegt werden, dass die Gal4-BD und Gal4-AD, welche in Fusion mit den beiden Proteinen exprimiert werden, keinen Einfluss auf die Struktur der Proteine und somit auf dessen Interaktion hatten. Im Gegensatz zum YTHS wurde im *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsnachweis ein Hop-Protein mit N-terminalem Flag-Epitop und C-terminaler Poly-His-Sequenz verwendet. Da CG17033 für den *in vitro* Interaktionsnachweis ohne eine flankierende Aminosäuresequenz exprimiert wurde und in beiden Interaktionssystemen eine Interaktion zwischen Hop und CG17033 zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch das Anhängen von zusätzlichen Aminosäuren die Strukturen von Hop und CG17033 nicht beeinträchtigt werden und somit eine nicht existente Interaktion, die in *Drosophila* nicht funktionell wäre, ausgeschlossen werden kann.

Bei dem mittels YTHS identifizierten Protein CG17033 handelt es sich um ein Protein mit einer TRAF-Domäne (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor). TRAF Proteine spielen in vielen Organismen eine überaus wichtige Rolle. Humane TRAFs stellen die wichtigste Gruppe an Signalüberträgern für die TNFR Superfamilie und die Interleukin-1 Rezeptor/Toll-ähnlicher Rezeptor (IL-1/TLR) Superfamilie dar. Dabei sind sie unter anderem bei der erworbenen und angeborenen Immunität und bei der Embryonalentwicklung beteiligt, die auf die Regulation der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und auf den Zelltod zurück zu führen sind. In *Drosophila melanogaster* wurde die Bedeutung der TRAFs bei der dorsoventralen Polarisierung und der angeborenen Immunabwehr nachgewiesen (Imler und Hoffmann, 2001; Preiss *et al.*, 2001).

Charakteristisch für TRAF Proteine ist die Präsenz einer C-terminalen TRAF Domäne, welche sich aus einer Coiled-Coil und sich anschließenden TRAF-C Domäne zusammensetzt (Rothe *et al.*, 1994). Die TRAF Domäne hat eine wichtige Rolle bei der Selbstassoziation und der Interaktion mit Rezeptoren und anderen Signalmolekülen inne, welche „upstream“ eines TRAF Proteins liegen (Takeuchi *et al.*, 1996). N-terminal weisen viele TRAF Moleküle, wie es auch bei CG17033 der Fall ist, eine RING-Finger und mehrere Zink-Finger Motive auf, die für die Weiterleitung des Signals an „downstream“ Komponenten wichtig sind (Rothe *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1996). Das RING-Finger Motiv stellt eine spezielle Variante des Zinkfinger Motivs dar. Durch seine Ausbildung kann es

zwei Zinkatome komplexieren und vermittelt somit Protein-Protein-Interaktionen. Die zwei bisher bekannten Varianten des RING-Fingers sind der C3HC4-Typ und der C3H2C3-Typ (C steht für Cystein, H für Histidin). Die typische Anordnung dieser Cysteine und Histidine wird durch folgende Sequenz beschrieben: C-x(2)-C-x(9 bis 39)-C-x(1 bis 3)-H-x(2 bis 3)-C/H-x(2)-C-x(4 bis 48)-C-x(2)-C (x ist eine beliebige Aminosäure).

Die Beteiligung der Familie der TRAF Proteine in einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden und ihren zellulären Antworten wurde vielfach in Zellkultur-Experimenten (Cao *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1999; Wallach *et al.*, 1999) und durch Geninaktivierungsstudien der Maus erforscht (Xu *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1999; Lomaga *et al.*, 1999). Für die humanen TRAF2 und TRAF6 Proteine wurde belegt, dass sie durch Aktivierung zweier verschiedener intrazellulärer Signalwege, des JNK- (c-Jun N-terminal kinase) und des NFκB-Signalwegs (Nuclear Factor κB), die Transkription von „downstream“ Zielgenen regulieren (Rothe *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1996; Nishito *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 1999). NFκB-Homologe spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen (Rothe *et al.*, 1995). Die überaus wichtige biologische Bedeutung der TRAFs wurde an TRAF-defizitären Mäusen erbracht. So führt der Verlust eines funktionellen TRAF3 Genprodukts in Mäusen zur postnatalen Letalität und zu einer fehlenden T-Zell-abhängigen Immunantwort (Xu *et al.*, 1996). TRAF4-defizitäre Mäuse hingegen zeigen eine ausgeprägte Fehlentwicklung des respiratorischen Apparates (Shiels *et al.*, 2000) und die Inaktivierung von TRAF5 führt zu Defekten in der CD40- und CD27-vermittelten Aktivierung der Lymphozyten (Nakano *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2000).

Derzeit sind zwei *Drosophila* TRAF Homologe, DTRAF1 und DTRAF2, bekannt. Durch biochemische und Zellkultur-Studien konnte gezeigt werden, dass auch in *Drosophila* die TRAF-abhängigen Signaltransduktionswege hoch konserviert sind (Kopp *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Zapata *et al.*, 2000). DTRAF2, welches die höchste Homologie zu humanem TRAF6 besitzt, interagiert mit *Drosophila* ECSIT und Pelle und aktiviert durch diesen Vorgang NFκB in Schneider-Zellen (Kopp *et al.*, 1999). DTRAF1 interagiert mit der *Drosophila* Ste20 Kinase (Misshapen, *msn*) und induziert somit eine synergistische Aktivierung von JNK in humanen Zellen (Liu *et al.*, 1999). Weiterhin zeigen dazu gegensätzliche Beobachtungen eine funktionelle Interaktion zwischen DTRAF1 und dem NFκB-Signaltransduktionsweg in Zellkultur-Experimenten (Zapata *et al.*, 2000), die durch neuere



Studien sogar wie ausgeschlossen werden können. *In vivo* Studien von DTRAF1 und DTRAF2 haben ergeben, dass lediglich DTRAF2 die Fähigkeit besitzt, den *Drosophila* NFκB-Signaltransduktionsweg zu aktivieren und somit die Transkription der NFκB-Zielgene *dipterizin*, *dptlp* und *drosomycin* zu erreichen (Cha *et al.*, 2003).

Bei dem mittels YTHS identifizierten *Drosophila* TRAF-Homolog handelt es sich um ein neues TRAF, das DTRAF3 genannt wurde (Jochen Bogin, Diplomarbeit 2000). Bei DTRAF3 könnte es sich um ein Adapterprotein handeln, welches zum Beispiel durch Bindung an einen TNF- oder Toll-Rezeptor Hop rekrutiert. Hop könnte in diesem Fall durch Phosphorylierung von IKK (IκB-Kinase) den TNF-Signaltransduktionsweg aktivieren. Aktiviertes IKK phosphoryliert Cactus (*Drosophila* IκB), ein Inhibitor, der im Zytoplasma mit Dorsal (*Drosophila* NFκB) assoziiert und dessen Kerntransport verhindert. Phosphorylierung von Cactus führt zur Dissoziation des Cactus/Dorsal Komplexes und ermöglicht somit Dorsal in den Zellkern zu gelangen und die Expression spezifischer Gene zu regulieren. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass weder der TNF-Rezeptor, noch TRAFs Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen und somit nicht in der Lage sind, IKK zu phosphorylieren. Hop könnte somit durch die Verknüpfung einer Janus-Kinase mit der Toll-Signaltransduktionskaskade die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in *Drosophila melanogaster* erreichen, wie auch schon zuvor die Wichtigkeit von NFκB-Homologen bei der Proliferation und Differenzierung von Hämocyten gezeigt wurde (Rothe *et al.*, 1995).

### 3.4. Weitere mögliche funktionelle Hop-Interaktionspartner

Mittels YTHS konnten 18 weitere Proteine identifiziert werden, die in diesem Experiment mit Hop interagieren. Durch die Identifizierung von Proteindomänen und die erste Eingliederung der molekularen Funktion und dem daraus folgenden biologischen Prozess ergaben sich erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Verknüpfung mit Hop. Die Eingliederung der nachfolgend aufgeführten Kategorien erfolgte durch die *in silico* Charakterisierung der unbekannten Proteine laut FlyBase Datenbank (<http://flybase.bio.indiana.edu>).

### 3.4.1. Adaptor-Proteine

CG9184 besitzt eine sogenannte C-terminale Molusken-Rhodopsin-Domäne, die in Verbindung mit einer DNA-abhängigen Transkriptionsregulation gebracht wird. Es kann vermutet werden, dass dieses Protein selbst an DNA binden kann und somit als potentieller Transkriptionsfaktor wirkt. Mit dieser Funktion könnten Parallelen zu dem bisher bekannten Hop-Interaktionspartner Stat92E geschlossen werden (Hou *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1997). Im Bezug auf den Blutzell-Phänotyp der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante kann vermutet werden, dass durch einen alternativen Transkriptionsfaktor die Überproliferation der Hämozyten erfolgt, die nicht durch ein inaktives Stat92e Genprodukt supprimiert werden kann.

CG11763 wurde laut Datenbank als ein Protein beschrieben, welches an Ran Proteine binden kann. Ran ist eine Ras-verwandte GTPase, die in diversen zellulären Prozessen wie Zellkern-Import, Zusammenbau der mitotischen Spindel und Neuaufbau der Kernmembran nach der Zellteilung, eine wichtige Rolle spielt. Bereits gut charakterisiert ist die Bindung des zytosolischen Ran-Bindungs-Proteins 1 (RanBP1) an Ran-GTP, welches im Zytosol die Nukleotidhydrolyse von Ran-GTP unterstützt (Macara, 2001). Es wurde gezeigt, dass RanBP1 an Ran-GTP durch eine Ran-Bindungs-Domäne bindet. Durch diese Bindung wird die RanGAP1-vermittelte (Ran GTPase-activating protein) Hydrolyse um ein Vielfaches *in vitro* gesteigert (Bischoff *et al.*, 1995). RanBP1 ist essentiell *in vivo* (Schlenstedt *et al.*, 1995), weil seine Funktion unumgänglich für die Nukleotidhydrolyse von Ran-GTP ist, welches wiederum an Rezeptoren für den Kern-Import gebunden ist (Bischoff *et al.*, 1997). In unserem speziellen Fall könnte das bedeuten, dass Hop durch Phosphorylierung auf die Regulation eines Ran-bindenden Proteins eingehen könnte. In wieweit dies zum Beispiel bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielt, so wie es für Cdc2 nachgewiesen wurde, muss durch weiterführende Untersuchungen *in vivo* belegt werden.

### 3.4.2. Proteine der Protein-Biosynthese

CG12261 wurde als ribosomales Strukturprotein eingeordnet und ist in Folge dessen eventuell bei der Protein Biosynthese beteiligt. CG4849 besitzt Ähnlichkeiten zu einer Elongationsfaktor G-Domäne, wodurch seine Funktion bei der Translations-Elongation zu vermuten ist. Einen Zusammenhang zwischen der *Drosophila melanogaster* Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade und Komponenten der Protein-Biosynthese wurde bisher durch die Anhäufung von D-eIF1A (*Drosophila* eukaryotischer Initiations-Faktor 1A) Transkripten in den Hämozyten und der Lymphdrüse von *Drosophila melanogaster*

beobachtet (Myrick und Dearolf, 2000). Es wurde vermutet, dass die D-eIF1A Transkription in einem *hop<sup>Tum-l</sup>* Hintergrund erhöht ist, oder die Transkripte im Vergleich zu der Wildtyp Situation unterschiedlich stabilisiert werden. Durch Überexpressions-Studien konnte aber gezeigt werden, dass eine gesteigerte Menge an D-eIF1A alleine nicht ausreicht, um die Hyperproliferation der Hämozyten und die Differenzierung der Plasmatozyten der *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutante zu erreichen.

Einige Hinweise lassen aber dennoch den Schluss zu, dass Proteine der eukaryotischen Translation, in unserem konkreten Fall CG12261 und CG4849, eine überaus wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen, insbesondere der Proliferation, einnehmen können (Clemens und Bommer, 1999). Die Überexpression von eIF4E kann in der Zellkultur die Transformation von Zellen bewirken und dieses Gen wird ebenfalls häufig in humanen Tumoren überexprimiert (DeBenadetti und Harris, 1999). Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Aktivität von humanen Genen, welche für Proto-Oncogene und Wachstumsfaktoren kodieren, vielfach auf der Ebene der Translationskontrolle reguliert werden (Van der Velden und Thomas, 1999). Interessanterweise bewirken Mutationen im *Drosophila ribosomal protein S6 (rsp6)* hämatopoetische Abnormalitäten, welche von der frühzeitigen Differenzierung der Plasmatozyten bis zu deren Überproliferation und Aggregation reichen (Watson *et al.*, 1991, 1992; Stewart und Denell, 1993). Zusammengefasst kann postuliert werden, dass Translationsfaktoren in *hop<sup>Tum-l</sup>* Mutanten überexprimiert werden und sie ein molekulares Ziel für die Hop-gesteuerte Hämatopoese sind.

### 3.4.3. Proteasen und DNAsen

CG4122 besitzt eine Zink Carboxypeptidase- und eine Metalloprotease-Domäne und wird durch seine Homologie in den biologischen Prozess der Kutikula Biosynthese eingeordnet. Da dieses Protein nur für den strukturellen Aufbau von *Drosophila* notwendig ist, spielt es höchstwahrscheinlich keine Rolle bei der Übertragung von Signalen und geht in folge dessen vermutlich keine funktionelle Interaktion mit Hop ein.

CG3016 besitzt durch eine C-terminale Ubiquitin Hydrolase-Domäne eine Ubiquitin-spezifische Protease Aktivität und hat somit laut Datenbank die Aufgabe der Protein Deubiquitinierung. Zur Zeit gibt es keine Anhaltspunkte darüber, wie Hop mit Proteinen für die Deubiquitinierung in Kontakt stehen sollen, um eine funktionelle Weiterleitung der Hop-Signale erreichen zu können.

CG8648 weist eine Exonuklease- und eine DNA-Bindemotiv-Domäne auf. Das Muster der DNA-Bindungsdomäne stellt aber kein typisches Merkmal der Transkriptionsfaktoren dar, sondern wird eher bei der DNA-Reparatur eingegliedert. Geht man von den bis dato bekannten Funktionen der Jak/Stat-Signaltransduktionskaskade aus, so läßt dies mit großer Wahrscheinlichkeit die Schlußfolgerung zu, dass es sich bei diesem Protein nicht um einen potentiellen funktionellen Interaktionspartner von Hop handelt.

#### 3.4.4. Zelloberflächen-Protein

CG2198 besitzt Domänen, welche typischer Weise bei Immunglobulinen und MHC Komplexen vorkommen. Als biologische Funktion wird laut Datenbank die Zelladhäsion angegeben. Sollte es sich hierbei wirklich um ein Protein handeln, welches auf der Zelloberfläche präsent ist, könnte durch die unterschiedliche Kompartimentierung von CG2198 und Hop keine Interaktion stattfinden. Auch für MHC-Proteine, die vor ihrer Präsentation auf der Zelloberfläche sich im Endoplasmatischen Reticulum befinden, ist die Interaktion mit Hop ausgeschlossen. Die funktionelle Bedeutung dieses Proteins für die Hop-vermittelte Signalübertragung ist somit ausgeschlossen.

#### 3.4.5. Proteine des Stoffwechsels / der Atmungskette

Die Domänen der Proteine CG12262, CG7433, CG11963 und CG6058 lassen darauf schliessen, dass ihre Aufgaben beim Fett-, Protein-, oder Kohlenhydratstoffwechsel liegen. Aufgrund dieser vier unabhängig identifizierten Proteine in einem YTHS kann man annehmen, dass sowohl Janus-Kinasen, als auch Komponenten verschiedener Stoffwechselsysteme ähnliche Motive besitzen, mit deren Hilfe sie in Kontakt zu weiteren Faktoren treten. Es bleibt aber dennoch weitestgehend ausgeschlossen, dass diese identifizierten Proteine mit Hop *in vivo* in Kontakt stehen können.

#### 3.4.6. Unbekannte Proteine

Bei den Proteinen CG12002, CG9083, CG9187, CG11486 und CG17032 handelt es sich um bisher unbekannte *Drosophila melanogaster* Proteine, die keine Homologien zu bekannten Proteinen oder deren Domänen zeigen. Die funktionelle Bedeutung dieser Proteine für die Hop-vermittelte Signalübertragung und deren eventuelle Beteiligung an der Proliferation und Differenzierung von Hämocyten kann nur in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Laborausstattung

Analytische Waage	Sartorius BP 2100S
Autoradiographiekassetten	Suprema, Dr. Goos
Binokular	Stemi SV6, Zeiss
Computer Hardware	
Power Book G4 800 MHz	Apple Corp.
Laser Drucker	Optra S1855, Lexmark
Laser Drucker	Dokuprint N2125
Computer Software	
Macintosh OSX 10.2.8.	Apple Corp.
Canvas 8.0	Deneba Software
Excel X für OSX	Microsoft Corp.
Word X für OSX	Microsoft Corp.
Photoshop 7.0	Adobe
Illustrator 10.0	Adobe
Lasergene Navigator	DNASStar
Linoscan	Linocolor Elite 6.0.1, Heidelberg
Safari 1.0	Apple Corp.
Acrobat Reader 6.0	Adobe
Openlab	Improvision
Drehrad	CMV, Tröbel
Eismaschine	Scotsman B-550
Elektrophoreseapparaturen	ZMBH Werkstatt
Feinwaage	Sartorius analytic A120S
Filmentwickler	Amersham Pharmacia Biotech
Fliegeninkubator	RUMED
Geltrockner	Drygel Sr., Modell SE 1160
Heizblock	Dri-Block® DB-2A, Techne
Kühlzentrifugen	Sorvall RC 5B, RC 5C, DuPont
Laborwippe	CAT ST5
Laborwaage	Sartorius BP 2100 S
Laborzentrifugen	Minifuge, Heraeus Instruments
Magnetrührer	Heidolph MR 3001
Mikrowellenherd	Panasonic
MilliQ Wasser System	Millipore® Molsheim, France
Netzgeräte	Biorad Power Pac 300
pH-Meter	MP 220, Mettler Toledo
Photometer	Ultrospect 3000, Amersham Pharmacia Biotech
Pipetten P10, P20, P200, P1000	Gilson Pipetman
Pipettierhilfe, elektr.	Accu-jet, Brand
Rotoren SS34, GS3, GSA	DuPont
Schüttelinkubator	Innova 4230, New Brunswick Scientific
Schüttler	GFL, Typ: 3005
Schüttelheizblock	Eppendorf Thermomixer 5436

SDS-PAGE Laufkammern	Miniprotean II & III, Biorad
Sf9 Spinner	Bellco glass
Sonifier digital	Branson 450D
Speed-Vac-Concentrator	Bachofer
Spektrophotometer	Ultrospect 3000, Pharmacia Biotech
Stickstoffbehälter	Isotherm, KGW
Thermozykler	MJ Research Inc. PTC-100
Tiefkühlschränke	Liebherr comfort (-20°C)
	Tritec Hannover (-20°C)
	Heraeus HFU-86 450 (-85°C)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instruments
Untertischzentrifuge	Heraeus Varifuge 30R
Reaktionsgefäßschüttler	Heidolph Reax 2000
Vakuumkonzentrator	Speed Vac Concentrator, Bachofer
Vortex	Heidolph REAX 2000
Wasserbad	SUB 14, Grant
Western-Blot Apparaturen	Mini Trans-Blot Transfer Cell, Biorad, ZMBH-Werksatt

## 4.2. Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäulen	BioRad
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Dialyse Membran	Regenerated Cellulose, Spectra PorMolecular porus membrane (6-8kDa), Spectrum neolab
Echthaarpinsel	Linker
Edelstahlprüfsiebe (1 mm, 25 µm)	Powder-Free Pehasoft, Hartmann; Nitrile N- Dex®, Best
Einmalhandschuhe	Greiner
Fliegenzuchtbehälter	0,2 und 0,45 µm, Cellulose Ester, Schleicher & Schuell
Filter	Whatman
Filterpapier (3 MM)	10 mm x 4 mm x 45 mm, Sarstedt
Küvetten	JETstar, Genomed
Maxi Kit	Qiagen
Midi Kit	Schleicher & Schuell
Membranfilter (0,2 µm, 0,4 µm)	Menzel-Gläser
Objekträger	KimWipes Lite 200, Kimberly Clark
Papiertücher	American National Can.
Parafilm	WU Mainz
Pasteur Pipetten	Qiagen
PCR-Purification kit	Greiner
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
Petrischalen	10, 20, 200 u. 1000 µl, Steinbrenner
Pipettenspitzen	Greiner
Polypropylenröhrchen (15/50 ml)	Qiagen
Qiaex II	0,5, 1,5 u. 2 ml, Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße	

Safelock Reaktionsgefäße	1,5 ml, Eppendorf
Spritzen	1, 5, 10 und 50 ml, Becton Dickinson
Spritzennadeln	0,4 x 20 mm, Braun
Transfermembran	PVDF, Schleicher & Schuell
X-OMAT™ AR-5	Kodak Scientific Imaging Film
	Amersham Pharmacia

### 4.3. Chemikalien, Enzyme, Proteine, Molekulargewichtsmarker

Nicht aufgeführte Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den Firmen Sigma (München), Merck AG (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Fluka AG (Buchs, CH) bezogen.

Agarose ultra pure	Gibco BRL
Alkalische Phosphatase Shrimp	Boehringer Mannheim
Aprotinin	Sigma
Baculovirus DNA	Baculo Gold, Pharmingen
	Baculo Sapphire, Orbigen
Bestatin	Sigma
BCIP	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
DAPI	Sigma
DNA-Standards	GeneRuler 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas
E-64	Sigma
Ethanol, 99 %	Zentrallager INF
Glyzerin, 99%	Zentrallager INF
Hefeextrakt	Gibco BRL
Isopropanol	Zentrallager INF
LB-Agar	USB
LB-Broth	USB
Leupeptin	Sigma
Lipofectin	Invitrogen
Lysozym	Roche
Maismehl	Scimart
Methanol	Zentrallager INF
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat	AppliChem
NBT	Boehringer Mannheim
Nickel-6-hydrat	Riedel-de-Häen
Nonident® P40	USB
Pepstatin	Sigma
Pepton	Gibco BRL
Proteinstandards	Broad range und Prestained, New England Biolabs
RNasin, Ribonuklease-Inhibitor	Promega
Restriktionsenzyme inkl. Puffer	New England Biolabs
	Roche
Saccharose	J.T. Baker

---

Sojamehl	Scimart
T4-DNA Ligase	Boehringer Mannheim
TaKaRa-DNA Polymerase	TaKaRa
TNT Coupled Reticulocyte Lysate System T7	Promega
Zitronensäure wasserfrei	Thomas Chemikalien

#### 4.4. Antikörper und Affinitätsmatrizen

Anti-Flag M2, Maus	Sigma
Anti-Flag M2 Agarose Affinity Beads	Sigma
Anti-GST, Kaninchen	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG AP-Konjugat	Promega
Anti-Maus-IgG AP-Konjugat	Promega
Anti-Myc, Maus	Upstate
Anti-Hop, Kaninchen	Diplomarbeit J. Bogin, 2000
Anti- <i>Drosophila</i> -Hämozyten H1, Maus	I. Ando
Anti-Maus-IgG Alexa546-Konjugat	Molecular Probes

#### 4.5. Radioaktive Substanzen

Redivue adenosine 5'-[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] triphosphate Triethylammonium salt 10 mCi / ml, > 5000 Ci / mmol (AA0018)	Amersham Pharmacia
Redivue [ <sup>35</sup> S]-methionine ( <i>in vitro</i> translation grade) 15 mCi / ml, > 1000 Ci / mmol (AG1594)	Amersham Pharmacia

#### 4.6. Bakterienstamm

XL1-blue (Bullock et al., 1987)  
*recA* (*recA1 lac<sup>-</sup> endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 {F' proAB lacI<sup>r</sup> lacZDM15 Tn10}*)

#### 4.7. Hefestamm

AH109 Matchmarker Competent Yeast-two-hybrid cells (Clontech)  
 MATa, trp-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-  
 GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ,  
 MEL1)



## 4.8. Fliegenstämme

Oregon R

*Drosophila melanogaster* Wildtypstamm

*C(1) DX, y<sup>l</sup> f<sup>l</sup> / FM7i, P{w<sup>+</sup>mC=ActGFP}JMR3*

(Jean-Marc Reichhart, Bloomington Stock # 4559)

Balancer-Stamm für das X-Chromosom welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*w<sup>\*</sup> ; In(2LR)noc<sup>4L</sup>Sco<sup>rv9R</sup>, b<sup>l</sup> / CyO, P{w<sup>+</sup>mC=ActGFP}JMR1*

(Jean-Marc Reichhart, Bloomington Stock # 4533)

Balancer-Stamm für das 2.-Chromosom welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*w<sup>\*</sup> ; Sb<sup>l</sup> / TM3, P{w<sup>+</sup>mC=ActGFP}JMR2, Ser<sup>l</sup>*

(Jean-Marc Reichhart, Bloomington Stock # 4534)

Balancer-Stamm für das 3.-Chromosom welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*hop<sup>Tum-l</sup> / FM7b, y<sup>31d</sup> sc<sup>8</sup> lz<sup>s</sup> B<sup>l</sup>*

(Hanratty and Ryerse, *Dev. Biol.* 1981, **83**(2):238-249)

Stamm mit einer Punktmutation G341E innerhalb des *hop*-Genes

*Df(2L)J17, b<sup>l</sup> / CyO*

(Clegg *et al. Genetics* 1993, **134**(1):221-230, Bloomington Stock # 6120)

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert

*Df(2L)J27, bsk<sup>J27</sup> / CyO, P{ry<sup>+</sup>t7.2=sevRas1.V12}FK1*

(L. Sandler, *Genetics* 1977, **86**:567-582, Bloomington Stock # 4367)

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert

*Df(2L)J77 / SM6b, al<sup>2</sup> Cy<sup>l</sup> dp<sup>lv1</sup> cn<sup>2P</sup> sp<sup>2</sup>, amos<sup>Roi-1</sup>*

(F. Salas, J.A. Lengyel, *D.I.S.* 1984, **60**:243-244, Bloomington Stock # 6121)

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert

*cdc2<sup>E1-9</sup> b pr cn / CyO*

(Clegg *et al. Genome* 1993, **36**:676-685, erhalten von C. Lehner, Bayreuth)

Stamm mit einer Punktmutation P242S innerhalb des *cdc2*-Genes

*ru<sup>l</sup> h<sup>l</sup> th<sup>l</sup> st<sup>l</sup> cu<sup>l</sup> sr<sup>l</sup> e<sup>s</sup> stg<sup>7M53</sup> ca<sup>l</sup> / TM3, Sb<sup>l</sup> Ser<sup>l</sup>*

(B.A. Edgar und P.H. O'Farrell, *Cell* 1989, **57**:177-187, Bloomington Stock # 2500)

Stamm mit einer Punktmutation innerhalb des *stg*-Genes

*stg<sup>AR2</sup> / TM3, Sb<sup>l</sup> Ser<sup>l</sup>*

(J. Großhans und E. Wieschaus, *Cell* 2000, **101**:177-187)

Stamm mit einer P-Element Insertion innerhalb des *stg*-Genes

*hop*<sup>Tum-1</sup> / *FM7i*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR3$

Stamm mit der Punktmutation G341E innerhalb des *hop*-Genes welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*Df(2L)J17*, *b*<sup>1</sup> / *CyO*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR1$

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert und welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*Df(2L)J27*, *bsk*<sup>J27</sup> / *CyO*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR1$

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert und welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*Df(2L)J77* / *CyO*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR1$

Stamm mit einer Teildeletion des 2. Chromosoms welche das *cdc2*-Gen deletiert und welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*cdc2*<sup>E1-9</sup> *b pr cn* / *CyO*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR1$

Stamm mit der Punktmutation P242S innerhalb des *cdc2*-Genes welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*ru*<sup>1</sup> *h*<sup>1</sup> *th*<sup>1</sup> *st*<sup>1</sup> *cu*<sup>1</sup> *sr*<sup>1</sup> *e*<sup>s</sup> *stg*<sup>7M53</sup> *ca*<sup>1</sup> / *TM3*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR2$ , *Ser*<sup>1</sup>

Stamm mit einer Punktmutation innerhalb des *stg*-Genes welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

*stg*<sup>AR2</sup> / *TM3*,  $P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR2$ , *Ser*<sup>1</sup>

Stamm mit einer P-Element Insertion innerhalb des *stg*-Genes welcher unter Kontrolle eines Actin Promotors das Protein GFP exprimiert

## 4.9. DNA

### 4.9.1. Oligonukleotide

Alle Nukleotide wurden von den Firmen Sigma oder Invitrogen synthetisiert.

#### 4.9.1.1. Oligonukleotide für PCR-Klonierungen

hop c-his for	5'-ATAATTCAT <u>ATGGCCCTGGCCAACGGGGGAGAGGAT</u> <u>AGAATGGACGACAGCAGCAGC</u> -3' Restriktionsschnittstelle: NdeI
hop c-his rev	5'-CCAATCTAGATTAATGATGATGATGATGCTCGAG <u>CCCGGGCTCGGCATCCGTCGGCTGATT</u> -3' Restriktionsschnittstellen: XbaI, XhoI, SmaI
hop for	5'-ATACAT <u>ATGGCCCTGGCCAACGGG</u> -3' Restriktionsschnittstelle: NdeI
hop rev	5'-ATATCTAGATCACTCGGCATCCGTCGG-3' Restriktionsschnittstelle: XbaI
hop JH7-JH4 rev	5'-TTCTCGAGGGGATTGAAGATCTGCGG-3' Restriktionsschnittstelle: XhoI
cg17033 for	5'-ATTAAGCTTCATATGGGCTACGATGTGAATCG-3' Restriktionsschnittstellen: HindIII, NdeI
cg17033 rev	5'-ATATCTAGACTCGAGCTACTCGATGCCATGG-3' Restriktionsschnittstellen: XbaI, XhoI
cg2944 for	5'-GCGGAATTCCATATGGAATTTGGTAAAAAAAGG-3' Restriktionsschnittstellen: EcoRI, NdeI
cg2944 rev	5'-TCGGGATCCTCTAGATTATCTACGGTTTTTATAC-3' Restriktionsschnittstellen: BamHI, XbaI
cdc2 for	5'-ATAATAACCCGGGATCTCGAGATGGAGGATTTTGAG-3' Restriktionsschnittstellen: SmaI, XhoI
cdc2 rev	5'-CCCTCTAGAGGATCCTTAATTTCGAACTAAGCC-3' Restriktionsschnittstellen: XbaI, BamHI

#### 4.9.1.2. Oligonukleotide für die *Site-directed* Mutagenese Reaktion von *hop*

hop <sup>D180E</sup> for	5'-GGACTGGCCGTGATGGAAATGCTAATCGAC GATCAGG-3'
hop <sup>D180E</sup> rev	5'-CCTGATCGTCGATTAGCAATTTCCATCACG GCCAGTCC-3'

hop <sup>K926A</sup> for	5'-GAGCAGGTTGCCATCGCGATGCTGAACACCATGC-3'
hop <sup>K926A</sup> rev	5'-GCATGGTGTTCAGCATCGCGATGGCAACCTGCTC-3'
hop <sup>D1014E</sup> for	5'-ACTCATCCACCGCGAGCTGGCCGCCCCGC-3'
hop <sup>D1014E</sup> rev	5'-GCGGGCGGCCAGCTCGCGGTGGATGAG-3'
hop <sup>Y1047F</sup> for	5'-GCCAATTCCGATGGATTTTACTATGCGAAA AGCAAGCG-3'
hop <sup>Y1047F</sup> rev	5'-CGCTTGCTTTTCGCATAGTAAAATCCATCG GAATTGGC-3'
hop <sup>Y1048F</sup> for	5'-GCCAATTCCGATGGATATTTCTATGCGAAA AGCAAGCG-3'
hop <sup>Y1048F</sup> rev	5'-CGCTTGCTTTTCGCATAGAAATATCCATCG GAATTGGC-3'
hop <sup>Y1049F</sup> for	5'-TCCGATGGATATTACTTTGCGAAAAGCAAG CGTGATATTCC-3'
hop <sup>Y1049F</sup> rev	5'-GGAATATCACGCTTGCTTTTCGCAAAGTAA TATCCATCGG-3'
hop <sup>Y1061F</sup> for	5'-ATTCCCATTAGATGGTTCTCTCCGGAGGCC ATCTCC-3'
hop <sup>Y1061F</sup> rev	5'-GGAGATGGCCTCCGGAGAGAACCATCTAATGGG-3'

#### 4.9.2. Plasmide

pBluescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene)  
Klonierungsvektor

pTβStop (H. Jantzen *et al.*, 1992)  
pT7βSal-Derivat (C. Norman *et al.*, 1988) mit einer Insertion einer  
multiplen Klonierungssequenz, gefolgt von drei STOP-Codons in drei  
verschiedenen Leserastern. Klonierungsvektor; *in vitro*-Expression

pVLFlag (Sauer *et al.*, 1995)  
pAcSG2 (Pharmingen)-Derivat mit einer Insertion der Sequenz für das FLAG-  
Epitop. Ermöglicht die Herstellung rekombinanter Baculoviren zur Expression  
NH<sub>2</sub>-terminal FLAG-Epitop-markierter Fusionsproteine in *Sf9*-Zellen

pVL-GST-Flag (S. Kwoczynski, 2002, unveröffentlichte Ergebnisse)  
pVLFlag-Derivat mit einer Insertion der Sequenz für das GST-Epitop. Ermöglicht  
die Herstellung rekombinanter Baculoviren zur Expression NH<sub>2</sub>-terminal  
GST-FLAG-Epitop-markierter Fusionsproteine in *Sf9*-Zellen

pGBKT7 (Clontech)  
Hefe-Expressionsvektor. Ermöglicht die Herstellung von NH<sub>2</sub>-terminal GAL4-  
DNA-Bindedomäne-cMyc-Epitop-markierter Fusionsproteine in Hefe-Zellen

pGADT7 (Clontech)

Hefe-Expressionsvektor. Ermöglicht die Herstellung von NH<sub>2</sub>-terminal GAL4-Aktivierungsdomäne-HA-Epitop-markierter Fusionsproteine in Hefe-Zellen

pACT2 (Clontech)

Hefe-Expressionsvektor. Ermöglicht die Herstellung von NH<sub>2</sub>-terminal GAL4-Aktivierungsdomäne-HA-Epitop-markierter Fusionsproteine in Hefe-Zellen

#### 4.9.2.1. Klonierung

pBluescript KS-*hop* (J.Bogin, Diplomarbeit 2000)

pBluescript KS-Derivat mit einer Insertion der 3,5 kb Vollängen *hop*-cDNA

pBluescript KS-*cg17033*

Das 1 kb-Fragment *cg17033* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg17033* for und *cg17033* rev aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde HindIII/XbaI geschnitten und in den HindIII/XbaI verdauten pBluescript KS Vektor kloniert.

pBluescript KS-*cg2944*

Das 1 kb-Fragment *cg2944* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cg2944* for und *cg2944* rev aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde EcoRI/BamHI geschnitten und in den EcoRI/BamHI verdauten pBluescript KS Vektor kloniert.

pBluescript KS-*cdc2*

Das 0,9 kb-Fragment *cdc2* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *cdc2* for und *cdc2* rev aus einem embryonalen *Drosophila*-cDNA-Pool amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde SmaI/XbaI geschnitten und in den SmaI/XbaI verdauten pBluescript KS Vektor kloniert.

pTβStop-*cg17033*

Das 1 kb-Fragment *cg17033* wurde mit NdeI/XbaI aus pBluescript KS-*cg17033* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XbaI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

pTβStop-*cg2944*

Das 1 kb-Fragment *cg2944* wurde mit NdeI/BamHI aus pBluescript KS-*cg2944* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/BamHI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

pDAC5-*hop*<sup>*tum-l*</sup> (Harrison *et al.*, EMBO 1995, **14**(12), 2857-2865)

pDAC5-Derivat mit einer Insertion der 3,5 kb Vollängen *hop*<sup>*tum-l*</sup>-cDNA. Das inserierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante G341E.

pTβStop-*hop*

pTβStop-Derivat mit einer Insertion der 3,5 kb Vollängen *hop*-cDNA. Das 3,5 kb Fragment wurde mit NdeI/NotI aus pBluescript KS-*hop* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/NotI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

**pTβStop-hop-His**

Das 3,5 kb Vollängen *hop*-cDNA Fragment mit C-terminalen 6xHis Tag wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *hop* c-his for und *hop* c-his rev aus pTβStop-*hop* generiert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde NdeI/XbaI verdaut und in den NdeI/XbaI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

**pTβStop-hop<sup>tum-l</sup>**

Das 3,5 kb Vollängen *hop<sup>tum-l</sup>*-cDNA Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *hop* for und *hop* rev aus pDAC5-*hop<sup>tum-l</sup>* amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde NdeI/XbaI verdaut und in den NdeI/XbaI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

**pTβStop-hop<sup>tum-l</sup>-His**

Das 3,5 kb Vollängen *hop<sup>tum-l</sup>*-cDNA Fragment mit C-terminalen 6xHis Tag wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *hop* c-his for und *hop* c-his rev aus pTβStop-*hop<sup>tum-l</sup>* generiert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde NdeI/XbaI verdaut und in den NdeI/XbaI verdauten pTβStop Vektor kloniert.

**pTβStop-hop<sup>D180E</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-*hop*-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *hop<sup>D180E</sup>* for und *hop<sup>D180E</sup>* rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante D180E.

**pTβStop-hop<sup>K926A</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-*hop*-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *hop<sup>K926A</sup>* for und *hop<sup>K926A</sup>* rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante K926A.

**pTβStop-hop<sup>D1014E</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-*hop*-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *hop<sup>D1014E</sup>* for und *hop<sup>D1014E</sup>* rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante D1014E.

**pTβStop-hop<sup>Y1047F</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-*hop*-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *hop<sup>Y1047F</sup>* for und *hop<sup>Y1047F</sup>* rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante Y1047F.

**pTβStop-hop<sup>Y1048F</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-*hop*-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide *hop<sup>Y1048F</sup>* for und *hop<sup>Y1048F</sup>* rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die *hop* Punktmutante Y1048F.

**pTβStop-hop<sup>Y1049F</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-hop-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide hop<sup>Y1049F</sup> for und hop<sup>Y1049F</sup> rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die hop Punktmutante Y1049F.

**pTβStop-hop<sup>Y1061F</sup>-His**

Dieses Konstrukt wurde aus pTβStop-hop-His mittels *Site-directed in-vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Oligonukleotide hop<sup>Y1061F</sup> for und hop<sup>Y1061F</sup> rev generiert. Das generierte Fragment kodiert für die hop Punktmutante Y1061F.

**pTβStop-hop JH7-JH4**

Das 1,42 kb-Fragment hop JH7-JH4 wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer hop for und hop JH7-JH4 rev aus pBluescript KS-hop amplifiziert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit NdeI/XhoI verdaut und in den NdeI/XhoI verdauten pTβStop-cg17033 kloniert. Das inserierte Fragment kodiert für die Aminosäuren 1 bis 474 des Hop-Proteins.

**4.9.2.2. Sf9-Expressionsvektoren****pVL-Flag-hop-His**

Das 3,5 kb-Fragment hop-His wurde mit NdeI/XbaI aus pTβStop-hop-His geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XbaI verdauten pVL-Flag Vektor kloniert.

**pVL-Flag-hop<sup>tum-l</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment hop<sup>tum-l</sup>-His wurde mit NdeI/XbaI aus pTβStop-hop<sup>tum-l</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XbaI verdauten pVL-Flag Vektor kloniert.

**pVL-Flag-hop<sup>D180E</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment hop<sup>D180E</sup>-His wurde mit NdeI/XbaI aus pTβStop-hop<sup>D180E</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XbaI verdauten pVL-Flag Vektor kloniert.

**pVL-Flag-hop<sup>K926A</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment hop<sup>K926A</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-hop<sup>K926A</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-hop-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-hop<sup>D1014E</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment hop<sup>D1014E</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-hop<sup>D1014E</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-hop-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-*hop*<sup>Y1047F</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment *hop*<sup>Y1047F</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-*hop*<sup>Y1047F</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-*hop*-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-*hop*<sup>Y1048F</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment *hop*<sup>Y1048F</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-*hop*<sup>Y1048F</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-*hop*-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-*hop*<sup>Y1049F</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment *hop*<sup>Y1049F</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-*hop*<sup>Y1049F</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-*hop*-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-*hop*<sup>Y1061F</sup>-His**

Das 3,5 kb-Fragment *hop*<sup>Y1061F</sup>-His wurde mit NsiI/XbaI aus pTβStop-*hop*<sup>Y1061F</sup>-His geschnitten, gereinigt und in den NsiI/XbaI verdauten pVL-Flag-*hop*-His Vektor kloniert.

**pVL-Flag-*hop* JH7-JH4-His**

Das 1,4 kb-Fragment *hop* JH7-JH4 wurde mit NdeI/XhoI aus pTβStop-*hop* JH7-JH4 geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI verdauten pVL-Flag-*hop*-His Vektor kloniert.

**pVL-GST-Flag-*cdc2***

Das 0,9 kb-Fragment *cdc2* wurde mit SmaI/BamHI aus dem pBluescript KS-*cdc2* geschnitten, gereinigt und in den SmaI/BglII verdauten pVL-GST-Flag Vektor kloniert.

**4.9.2.3. Yeast-two-hybrid und Hefe Expression****pGBKT7-*hop fl***

pGBKT7-Derivat mit einer Insertion der 3,5 kb Vollängen *hop*-cDNA. Das 3,5 kb Fragment wurde mit NdeI/SmaI aus pTβStop-*hop* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/SmaI verdauten pGBKT7 Vektor kloniert.

**pGADT7-*cg17033***

Das 1 kb-Fragment *cg17033* wurde mit NdeI/XhoI aus pBluescript KS-*cg17033* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/XhoI verdauten pGADT7 Vektor kloniert.

**pGADT7-*cg2944***

Das 1 kb-Fragment *cg2944* wurde mit NdeI/BamHI aus pBluescript KS-*cg2944* geschnitten, gereinigt und in den NdeI/BamHI verdauten pGADT7 Vektor kloniert.

**pGADT7-*cdc2***

Das 0,9 kb-Fragment *cdc2* wurde mit SmaI/BamHI aus pBluescript KS-*cdc2* geschnitten, gereinigt und in den SmaI/BamHI verdauten pGADT7 Vektor kloniert.



## 4.10. Medien, Puffer und Stammlösungen

### 4.10.1. Antibiotika

Ampizillin (Na-Salz)	100 mg/ml
Chloramphenikol	30 mg/ml in Ethanol
Kanamyzin	20 mg/ml
Tetrazyklin	5 mg/ml

### 4.10.2. Medien und Lösungen zur Hefekultur

YEPA-Vollmedium (600 ml):	6 g	Hefeextrakt
	12 g	Pepton
	36 mg	Adenin Hemisulfat
	36 mg	Uracil
	36 mg	Tyrosin
	24 ml	50% Glukose (w/v)
	ad 600 ml	H <sub>2</sub> O

SD-Medium (600 ml):	4 g	yeast nitrogen base ohne Aminosäuren
	36 mg	Adenin Hemisulfat
	36 mg	Uracil
	36 mg	Tyrosin
	24 ml	50% Glukose (w/v)
	6 ml	100 x drop-out Mix
	ad 600 ml	H <sub>2</sub> O

SD-Medium / ade <sup>-</sup> (600 ml):	4 g	yeast nitrogen base ohne Aminosäuren
	36 mg	Uracil
	36 mg	Tyrosin
	24 ml	50% Glukose (w/v)
	6 ml	100 x drop-out Mix
	ad 600 ml	H <sub>2</sub> O

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem entsprechenden Medium 2 % Agar-Agar hinzugefügt.

100 x drop-out Mix	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l
	L-Arginin HCl	200 mg/l
	L-Histidin HCl	200 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l

ONE-STEP Puffer	200 mM 40 % 100 mM	LiAc PEG DTT
STET-Puffer	8 % 50 mM 50 mM 5 %	Saccharose EDTA Tris-HCl, pH 8,0 Triton X-100

#### 4.10.3. Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

LB-Medium	1 % 0,5 % 0,5 %	Pepton Hefeextrakt NaCl
SOB-Medium	0,5 % 10 mM 2,5 mM 10 mM 10 mM pH 7, steril filtrieren	Hefeextrakt NaCl KCl MgCl <sub>2</sub> MgSO <sub>4</sub>

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem entsprechenden Medium 1,5 % Agar-Agar hinzugefügt.

TBJap	10 mM 15 mM 250 mM mit KOH auf pH 6,7 einstellen 55 mM steril filtrieren	Pipes CaCl <sub>2</sub> KCl MnCl <sub>2</sub>
-------	---	--

#### 4.10.4. Lösungen für SDS-PAGE

4× Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	Tris/HCl, pH 6,8 SDS
4× Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	Tris/HCl, pH 8,8 SDS
2× Proteingelprobenpuffer	125 mM 3 % 3 % 20 % 0,02 %	Tris/HCl, pH 6,8 SDS β-Mercaptoethanol Glyzerin Bromphenolblau

10× Proteingel-Laufpuffer	0,25 M	Tris
	2 M	Glyzin
	1 %	SDS

#### 4.10.5. Lösungen für Coomassie Färbungen von Proteingelen

Coomassie-Färbelösung	0,2 %	Coomassie R250
	10 %	Essigsäure
	45 %	Methanol
Entfärber	10 %	Essigsäure
	45 %	Methanol

#### 4.10.6. Lösungen für die Silberfärbung von Proteingelen

Fixierlösung	50 %	Ethanol
	12 %	Essigsäure
	0,0185 %	Formaldehyd
Waschlösung	50 %	Ethanol
Vorbehandlungslösung	0,02 % (w/v)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> •5 H <sub>2</sub> O
Färbelösung	0,2 % (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
	0,028 %	Formaldehyd
Entwickler	6 % (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,019 %	Formaldehyd
	0,0004 %	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> •5 H <sub>2</sub> O
	(w/v)	
Stopplösung	44 %	Ethanol
	12 %	Essigsäure

#### 4.10.7. Lösungen für Western Blot

Transfer-Puffer	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	0,01 %	SDS
	2 %	Methanol
TBST-Puffer	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Tween20

Blocklösung	20 mM 150 mM 0,1 % 5 %	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl Tween20 Magermilchpulver
AP-Puffer	100 mM 100 mM 50 mM	Tris/HCl, pH 9,5 NaCl MgCl <sub>2</sub>
NBT-Stammlösung	100 mg NBT in 1 ml 70 % DMF	
BCIP Stammlösung	50 mg BCIP in 1 ml 100 % DMF	

#### 4.10.8. Häufig verwendete Stammlösungen / Puffer

Ethidiumbromid	10 mg/ml in 1× TBE-Puffer	
HEMG	25 mM 12,5 mM 0,1 mM 10 %	Hepes pH 7,6 MgCl <sub>2</sub> EDTA Glycerin
10× TBE-Puffer	900 mM 900 mM 30 mM	Tris/HCl Borsäure EDTA
1x TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,6 EDTA
10x DNA-Probenpuffer	1x 50 % 0,25 %	TBE Glycerin Orange G
1x Lysepuffer für Minipräp	50 mM 65 mM 0,4 % 2,5 M 250 µg/ml	Tris/HCl, pH 7,6 EDTA, pH 8,0 Triton X-100 LiCl Lysozym
1 x Reaktionspuffer für <i>lacZ</i> -Nachweis	100 mM 10 mM 1 mM 0,25 % 2 %	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl MgSO <sub>4</sub> β-Mercaptoethanol X-Gal Lösung (20 mg/ml)

## 4.11. Standardmethoden zur Analyse und Manipulation von DNA

### 4.11.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach Okayama *et al.*

Um hochkompetente *E. coli*-Zellen für die Transformation von Plasmid DNA zu erhalten, wurde die von Inoue *et al.* publizierte Methode von Okayama *et al.* für *E. coli*-XL1blue optimiert (Inoue *et al.*, 1990).

5 ml einer bei 37°C in LB Medium gewachsenen ÜNK wurden in 250 ml SOB-Medium gegeben und für ca. 31 h bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  bei 18 °C wachsen gelassen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und mit einem vorgekühlten GS3-Rotor (4000 UpM, 10 min, 4 °C) zentrifugiert. Die Bakterien wurden in eisgekühltes 80 ml TBjap+DMSO (100 ml TBjap + 2 ml DMSO) aufgenommen und für 10 min auf Eis gehalten. Nach nochmaliger Zentrifugation (4000 UpM, 10 min, 4 °C) wurden die Bakterien im Kühlraum in 18,6 ml eiskaltem TBjap aufgenommen. Zu der Suspension wurden 1,4 ml DMSO zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde die Suspension in 200 µl Aliquots in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### 4.11.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Nukleinsäuren absorbieren Licht im UV Bereich. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm, das von RNA und Proteinen (aromatische Aminosäurereste) bei 280 nm. Zur Bestimmung der DNA Konzentration einer Lösung wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer (Amersham Pharmacia) gemessen. Parallel dazu wurde zur Bestimmung des Grades der Verunreinigung mit RNA und Proteinen die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Der Quotient von  $OD_{260} / OD_{280}$  ist ein Indikator für die Reinheit der DNA und liegt bei "reinen" Lösungen zwischen 1,8 und 2,0. Die Messung fand in einer 100 µl Quarzküvette (Hellma) mit einer Schichtdicke von 10 mm statt.

Für die Berechnung der DNA Konzentration wurde folgende konventionelle Maßeinheit angewendet: Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA / ml.

### 4.11.3. Ethanol Präzipitation

Bei der Zugabe von Ethanol zu einer DNA Lösung kommt es in Gegenwart hoher Konzentrationen monovalenter Kationen zur Aggregation und zur nachfolgenden Präzipitation von DNA (Ibelgaufs, 1993).

Zur Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Lösung für mindestens eine Stunde bei -80°C inkubiert. Die DNA wurde daraufhin durch Zentrifugation (13000 UpM, 20 Min, 4°C) der Lösung präzipitiert, das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und durch erneute Zentrifugation (13000 UpM, 5 Min, 4°C) repräzipitiert. Nachfolgend wurde das Präzipitat im „Vakuum-Konzentrator“ (Bachofer) getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.11.4. Restriktionsverdau von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifische DNA Sequenzen erkennen und schneiden. Dabei entstehen glatte (blunt ends) oder einander komplementäre 5'- bzw. 3'- überhängende (sticky ends) Enden.

Der Restriktionsverdau von DNA wurde in Volumina von 20 µl (analytisch) bis 100 µl (präparativ) durchgeführt. Es wurden die vom Hersteller (New England Biolabs, Roche) empfohlenen Reaktionspuffer verwendet. Je nach Ansatz wurden 1-10 µg DNA für eine Stunde bis unN bei der für die verwendeten Enzyme empfohlenen Temperatur verdaut.

#### 4.11.5. Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der zu bearbeitenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2 %ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen und in 1× TBE (90 mM Tris-Borat, 2mM EDTA) durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Danach wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Lösung in einen „Gelschlitten“ gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10× Probenpuffer (1× TBE, 50 % Glyzerin, 0,25 % Orange G) versetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde „Gene-Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ (MBI) verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

#### 4.11.6. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Qiaex II-Kit (Qiagen) verwendet. Es basiert auf einer reversiblen, pH-abhängigen Interaktion von DNA mit einer Glasmatrix (Boyle & Lew, 1995). Im niederen pH-Bereich bindet die DNA an die Glasmatrix und kann nach beliebigen Waschschritten durch Erhöhung des pH-Wertes von der Silikamatrix eluiert werden. Die Isolierung erfolgte genau nach Angaben des Herstellers.

#### 4.11.7. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet, um cDNAs aus embryonalen *Drosophila* cDNA-Pools oder Fragmente bereits klonierter cDNAs zu amplifizieren. Dabei wurden zur weiteren Klonierung durch die spezifischen Primer geeignete Restriktionsschnittstellen an die 3'- und 5'-Enden der Amplifikate angefügt. PCR-Ansatz (nach Angaben zur ExTaq-Polymerase (TaKaRa)): 50-100 ng Template DNA oder 5 µl des cDNA-Pools, 1,25-2,5 U ExTaq-Polymerase (TaKaRa), 10 µl 10× ExTaq-Puffer, 8 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 0,2-1 µM Primer 1 und Primer 2 (Endkonzentration), ad 100 µl H<sub>2</sub>O. Schmelztemperatur: 94 °C (30 sek), Annealingtemperatur: etwa 5 °C unterhalb der angegebenen Schmelztemperatur der Primer (1 min), Elongationstemperatur: 72 °C (1 min pro 1 kb-Fragment). 25-35 Wiederholungen und zum Abschluss einen weiteren Elongationsschritt aber 50-100 % länger um sicher zu gehen, dass alle Amplifikate vollständig sind.

#### 4.11.8. Automatische Sequenzierung von DNA

DNA Sequenzierungen wurden in unserem Auftrag von der Firma TopLab ([www.toplab.de](http://www.toplab.de) , München) oder SeqLab ([www.seqlab.de](http://www.seqlab.de) , Göttingen) durchgeführt.

#### 4.11.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

##### 4.11.9.1. Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)

1,5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie aus einer Ligation (siehe 4.11.11.) oder gerichteten Mutagenese Reaktion (siehe 4.11.13.) angeimpft und üN bei 37°C auf einem Drehrad inkubiert. Die üN-Kultur wurde durch Zentrifugation (3000 UpM, 5 Min) pelletiert und nachfolgend in 200 µl Lyse-Puffer (250 µg/ml Lysozym (Sigma), 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 65 mM EDTA (pH 8), 0,4% Triton X-100, 2,5 M LiCl) resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 90 Sek bei 95°C gekocht und unmittelbar danach kurz auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation des Ansatzes (13000 UpM, 8 Min) wurden chromosomale DNA und denaturierte Proteine präzipitiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Volumen 2-Propanol zum Probenansatz gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (13000 UpM, 20 Min) präzipitiert, anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und durch erneute Zentrifugation (13000 UpM, 5 Min) repräzipitiert. Das Präzipitat wurde im „Vakuum-Konzentrator“ (Bachhofer) getrocknet, anschließend in 20-50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

##### 4.11.9.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Midi- / Maxi-Prep)

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde unter Verwendung des Qiagen Midi- oder Maxi-Plasmid Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA Präparation nach Qiagen basiert auf der Methode „Alkalische Lyse“ von Birnboim und Doly (1979) und beruht auf der Erkenntnis, dass unter alkalischen Bedingungen chromosomale DNA denaturiert, superhelikale Plasmid-DNA hingegen nicht. Bakterien einer üN-Kultur werden im alkalischen Milieu in Gegenwart von SDS lysiert und das Bakterienlysate durch Zugabe von Natriumacetat neutralisiert. Denaturierte chromosomale DNA und Proteine werden daraufhin durch Zentrifugation präzipitiert und so von der nativen Plasmid-DNA in der wässrigen Phase getrennt. Die Isolierung der Plasmide aus der wässrigen Phase erfolgt durch reversible Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix, von der sie nach mehreren Waschschritten durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert wird. Die DNA wurde in 100 µl (Midi) oder 500 µl (Maxi) H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.11.10. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Für den Einbau von Fremd-DNA in einen linearisierten Klonierungsvektor (siehe 4.11.4.) wird das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet, welche die Verknüpfung von freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Gruppen doppelsträngiger DNA katalysiert. Bei der Ligation von Vektor und DNA Fragment sind sowohl intra- als auch intermolekulare Reaktionen möglich. Die Abspaltung des 5'-Phosphat-Restes der Vektor DNA durch das Enzym alkalische Phosphatase verhindert die Religation des Vektors.

Plasmidvektoren wurden zunächst durch Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert (siehe 4.11.4.). Zur Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz mit 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer (Boehringer) versetzt und nach Zugabe von 1U „Shrimp alkalische Phosphatase“ (Boehringer) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und gereinigt.

#### 4.11.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten dephosphorylierten Plasmiden erfolgte in einem Volumen von 20 µl für 4 h bei RT oder bei 16 °C üN. Je nach Größe wurden 50-100 ng Plasmid und das zu inserierende DNA-Fragment im dreifachen molaren Überschuß verwendet. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche). Alternativ wurde das „Quick Ligation Kit“ (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ligationsansätze wurden nach

Inkubation entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 4.11.12.).

#### 4.11.12. Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetente *E.coli*-Bakterien sind in der Lage, bei kurzzeitiger Erhöhung der Temperatur, Plasmid-DNA aufzunehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen entweder das Antibiotikaresistenzgen *amp<sup>R</sup>* oder *kan<sup>R</sup>*. Diese Resistenzgene erlauben es Bakterien nach Aufnahme der Plasmide in Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltigem Medium zu wachsen, und ermöglichen es somit, diese Plasmide selektiv in großen Mengen in *E.coli* zu produzieren.

10-20 µl eines Ligationsansatzes (siehe 4.11.11.) oder 20-100 ng Plasmid-DNA wurden vorsichtig mit 100 µl einer eiskalten Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 90 sek auf 42 °C erwärmt (Hitzeschock) und sofort wieder auf Eis gekühlt. Danach wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden (Tischzentrifuge, 4000 Upm, 5 min) zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Die Zellen wurden mit dem im Eppendorfgefäß verbliebenen Rest (ungefähr 100 µl) resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

Kontrollansätze:

- kompetente Zellen ohne DNA (Negativkontrolle)
- Transformation mit definierter Menge cDNA (Positivkontrolle)



#### **4.11.13. Gerichtete Mutagenese von DNA *in vitro***

Die gerichtete Mutagenese wurde entsprechend den Anweisungen für das „Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Abgewichen vom Protokoll wurde bei einigen Reaktionen von der im Protokoll angegebenen PfuTurbo DNA Polymerase. Bei einigen Reaktionen wurde die ExTaq DNA-Polymerase von TaKaRa und anstatt der „XL1-Blue supercompetent cells“ von Stratagene wurden die kompetenten XL1-Blue-Zellen nach Inoue *et al.* (siehe 4.11.1.), verwendet.

### **4.12. Standardmethoden zur Analyse von Proteinen**

#### **4.12.1. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen**

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 4.12.4.) im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele für 1 h mit einer Coomassie-Färbelösung (0,25% Brilliant Blue R250 (Serva), 45% Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert. Die Färbelösung wurde abgeschüttet und die noch in der Färbeschale verbleibende Färbelösung wurde vor Zugabe der Entfärbelösung mit Wasser ausgespült. Anschließend wurde das Gel durch Inkubation mit Entfärbelösung (45% Methanol; 10% Essigsäure) so lange entfärbt, bis sich die gewünschten Proteinbanden deutlich vom Gelhintergrund abhoben. Das gefärbte Gel wurde in Wasser aufgenommen, dokumentiert und anschließend in einem Vakuum-Geltrockner bei 80°C auf Whatman-Papier getrocknet.

#### **4.12.2. Silber-Färbung von SDS-Gelen**

Mit der Silberfärbung kann man Banden sichtbar machen, die nur 1-10 ng Protein enthalten. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft von Silberionen in alkalischem Milieu mit Proteinen zu komplexieren und unter reduzierenden Bedingungen Silberaggregate bilden. Ein bereits mit Coomassie gefärbtes Gel kann mit Silber nachgefärbt werden.

Das Gel wurde für mindestens eine Stunde in Fixierlösung (4.10.6.) gegeben. Anschließend wurde es 3 × 20 min in 50 % Ethanol gewaschen, für 20-60 sek in Vorbehandlungslösung geschwenkt, dreimal mit H<sub>2</sub>O (je 20 sek) gespült und für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Nach Abkippen der Färbelösung wurde das Gel mehrmals mit H<sub>2</sub>O gespült. Hierbei sollte darauf geachtet werden, daß auch die Gelunterseite von überschüssigem Silber befreit wird. Nach dem Waschvorgang wurde das Gel in Entwickler (4.10.6.) geschwenkt bis die gewünschte Färbintensität erreicht war. Der Entwickler wurde abgeschüttet und der Färbeprozess durch Zugabe von Stopplösung (4.10.6.) beendet. In diesem Zustand wurde das Gel dokumentiert. Anschließend wurde es in Wasser rehydriert und auf Whatman-Papier in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

#### **4.12.3. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem SDS/Tris/Glyzin-Puffersystem (25 mM Tris, 200 mM Glyzin, 0,1% SDS) nach Laemmli (1970).

Zur Auftrennung der Proteine wurde, dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine entsprechend, eine 8 – 10% ige Matrix aus polymerisiertem Acrylamid hergestellt. Hierzu wurde zuerst das Trenngel (8 – 10% Acrylamid, 1x Trenngelpuffer [375 mM Tris (pH 8,8), 0,1% SDS], 0,1% TEMED, 0,6% APS) zwischen zwei Glasplatten mit Abstandhaltern gegossen und, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten, mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das 2-Propanol abgeschüttet und gründlich mit Wasser gespült. Das überschüssige Wasser wurde mit Kimwipes-Tüchern (Kimberley Clark) entfernt und das Sammelgel (4% Acrylamid, 1x Sammelgelpuffer [125 mM Tris (pH 6,8), 0,1% SDS], 0,1% TEMED, 0,6% APS) auf das Trenngel gegossen und sofort der Kamm in die Lösung geschoben.

Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (5% Glyzerol, 2,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,5% SDS, 62,5 mM Tris (pH 6,8), 0,1% Bromphenolblau) 5 Minuten bei 100°C aufgeköcht, zentrifugiert (13000 UpM, 6 Min, RT) und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Das Kochen der Proben in SDS- und  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltigen Puffer zerstört die räumliche Struktur (Sekundär-, Tertiär- und Quatärstruktur) der Proteine. Das negativ geladene SDS lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine an, wodurch diese in einem elektrischen Feld eine ihrem Molekulargewicht entsprechende Laufstrecke zur Anode hin zurücklegen.

Die Elektrophorese wurde bei Minigelen (7 x 10 cm, Mini Protean III System, BioRad) mit 100 V, bei Maxigelen (30 x 50 cm, ZMBH Werkstatt) mit 200 V gestartet und nach Eindringen der Proben in das Sammelgel der Gelgröße entsprechend auf 200 V, bzw. 300 V erhöht.

#### **4.12.4. Immunologischer Nachweis gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)**

Neben der Coomassie- und der Silberfärbung können durch die Technik des Western Blots Proteine nach der SDS-PAGE sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zur Färbung der Proteingele durch die Coomassie- oder Silberfärbung kann man jedoch durch diesen immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörper die sichtbaren Banden einem bestimmten Protein zuordnen. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster bleibt dabei auf der Transfermembran erhalten.

Als Transfermembran wurde eine PVDF-Membran verwendet. Die PVDF-Membran ist sehr hydrophob und muß daher vor dem Elektrotransfer kurz mit Methanol benetzt werden. Anschließend wurde die Membran bis zum Gebrauch in Transferpuffer gelegt.

Nach erfolgter SDS-PAGE (siehe 4.12.4.) wurde das Gel durch folgende Anordnung für den Elektrotransfer vorbereitet:

(Kathode)  
Schaumstoff  
3 Lagen Whatman-Papier  
Trenngel  
PVDF-Membran  
3 Lagen Whatman-Papier  
Schaumstoff  
(Anode)

Alle Komponenten wurden mit Transferpuffer getränkt und direkt auf dem Kunststoffeinsatz, der die Anordnung während des Elektrotransfers zusammenhält, luftblasenfrei aufeinandergelegt. Dieser Aufbau wurde senkrecht in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer geschoben. Der Elektrotransfer wurde bei 300 mA für eine Stunde (Mini Trans-Blot Transfer Cell, BioRad) durchgeführt.

Nach dem Transfer folgte der immunologische Nachweis der Proteine mittels alkalischer Phosphatase. Vor der eigentlichen Detektion der Proteine mit einem spezifischen Antikörper müssen unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden. Hierzu wurde die Membran in einer 5 % Magermilchpulver-TBST-Lösung (1 h, RT oder üN, 4 °C) inkubiert.

Danach erfolgte die Inkubation (1 h, RT oder üN, 4 °C) mit dem ersten Antikörper, der in einer geeigneten Verdünnung in 1× TBST (4.10.7.) angesetzt wurde. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen (2 × Spülen, 3 x 10 min, RT) mit 1× TBST entfernt. Die Zweit-Antikörper (Alkalische Phosphatase gekoppelte Konjugate) wurden in 1× TBST verdünnt und für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper gewaschen (2 × Spülen, 3 x 10 min, RT).

Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Membran mit AP-Puffer (4.10.7.) gespült und anschließend mit der Detektionslösung (4,5 µl NBT + 3,5 µl BCIP pro ml AP-Puffer) so lange inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität der Proteinbanden erreicht war. Die Detektionslösung wurde abgekippt und die Membran intensiv mit Wasser gespült, anschließend getrocknet und dokumentiert.

## **4.13. Standardmethoden zum „Yeast-Two-Hybrid“ System**

### **4.13.1. Herstellung selektiver Hefeplatten**

Zur Selektion mutanter Hefestämme wurden Agarplatten mit unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung hergestellt. Diese Selektionsplatten wurden für den Y2H-Screen verwendet, um das Wachstum mutanter Hefestämme und somit die Expression der entsprechenden Reportergene nachweisen zu können.

Dazu wurde SD-Hefemedium in 268 ml Wasser und die entsprechende Menge an Agar-Agar in 300 ml Wasser durch autoklavieren gelöst. Nach dem getrennten Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf ungefähr 60°C wurde dem SD-Medium 24 ml 50 % Glukose (w/v, steril filtriert) und 6 ml des entsprechenden 100 x drop-out Mixes (steril filtriert) zugegeben. Anschließend wurde, um Luftblasenbildung zu vermeiden, die Agar-Lösung dem Medium vorsichtig zugegeben und mit Hilfe eines bereits in der Lösung mitautoklavierten Magnetrührfisches vermischt. Danach wurden die Agarplatten unter einer Sterilbank gegossen. Die abgekühlten Selektionsplatten wurden bis zur weiteren Verwendung gut verpackt bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.13.2. Transformation kompetenter Hefezellen (rapid one step)

Kompetente Hefezellen sind in der Lage bei Erhöhung der Temperatur (Hitzeschock), Plasmid-DNA aufzunehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide tragen unterschiedliche Selektionsgene, die für die Herstellung von Aminosäuren bzw. einer Base, benötigt werden. Diese Selektionsgene erlauben es dem mutanten Hefestamm ( $\text{trp}^-/\text{leu}^-/\text{ade}^-/\text{his}^-$ ) nach Aufnahme der transformierten Plasmide in Minimalmedien ohne die entsprechenden Aminosäuren / Base zu wachsen und ermöglichen es somit, diese Plasmide in Hefe zu etablieren.

Für die Transformation der Hefen wurden mit einer Impföse 10 ml YEPD-Medium mit Zellen des AH109 Hefestammes angeimpft und bei 30 °C auf einem Schüttler (100 UpM) bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 10$  inkubiert. Diese ÜNK wurde mit YEPD-Medium auf eine  $\text{OD}_{600} = 5$  verdünnt. 1 ml dieser verdünnten Hefekultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 UpM, 10 Sek, RT). Das Hefepellet wurde einmal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und anschließend in 100 µl ONE-STEP Puffer durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 2 µl Träger-ssDNA (10 µg/µl Yeastmaker Carrier-ssDNA, Clontech) zugegeben, welche zuvor für 5 Min bei 100 °C aufgeköcht und anschließend für 5 Min auf Eis abgekühlt wurde. Anschließend wurde das zu transformierende Plasmid in einer Menge zwischen 0,2 µg bis 1 µg zugegeben und kurz gemischt. Der Transformationsansatz wurde im Wasserbad bei 45 °C für 30 Min inkubiert, anschließend 1 ml MilliQ zugegeben, gemischt, in der Tischzentrifuge zentrifugiert (13000 UpM, 10 Sek, RT) und das Pellet in 1 ml YEPD resuspendiert. 100 µl der Hefesuspension wurden direkt auf entsprechende Selektivmedien ausplattiert.

#### 4.13.3. Transformation von Plasmidbibliotheken in Hefezellen

Die in dieser Arbeit verwendete modifizierte Methode der Lithiumacetat-Transformation wurde von Gietz *et al.* (1998) übernommen, die auf Grundlage der Transformation kompetenter Hefe-Zellen basiert (siehe 4.13.2.).

Für die Transformation wurde eine ÜNK des AH109 Hefestammes im entsprechenden Selektionsflüssigmedium angeimpft, welcher das transformierte Bait-Plasmid trug (siehe 4.13.2.). Von dieser ÜNK wurden  $\text{OD}_{600} = 25$  Einheiten abgemessen, das entsprechende Volumen in ein 15 ml Polypropylenröhrchen (Greiner) überführt und in einer Untertischzentrifuge zentrifugiert (3000 UpM, 5 Min, 4 °C). Das Hefepellet wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und nochmals unter gleichen Bedingungen pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und bei 30 °C für 15 Min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (3000 UpM, 5 Min, 4 °C), der Überstand verworfen und zum Pellet folgende Substanzen in absteigender Reihenfolge zugegeben:

2,4 ml	50 % PEG
0,36 ml	1 M LiAc
0,5 ml	Träger-ssDNA (10 mg/ml)
5,0 µl	Plasmidbibliothek-DNA (1 µg/µl)
0,34 ml	$\text{H}_2\text{O}$

Die Suspension wurde für 5 Min gemischt, für 30 Min bei 30 °C und anschließend für 45 Min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurde der Ansatz zentrifugiert (3000 UpM, 8 Min, 4 °C), einmal mit MilliQ gewaschen und das Pellet in 10 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die gesamten 10 ml Suspension wurden danach auf 90 bis 100 entsprechende Selektionsplatten (siehe 4.13.1.) ausplattiert.

#### **4.13.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde nach einem modifizierten Protokoll von Robzyk & Kassir (1992) durchgeführt. Diese Methode nutzt Glaskügelchen und Detergenzien um Hefezellen aufzubrechen. Die freigesetzten Plasmide werden durch eine DNA-Präzipitation (siehe 4.11.3.) gefällt und gereinigt.

2 ml einer ÜNK, welche unter selektiven Bedingungen gewachsen ist, wurde zentrifugiert (13000 UpM, 10 Sek, RT), das Pellet in 0,1 ml STET-Puffer resuspendiert, mit 0,1 ml Glaskügelchen (Ø 0,45 µm) versetzt und für 5 Min gevortext. Es wurden nochmals 100 µl STET-Puffer zugegeben, die Suspension für 3 Min bei 100 °C gekocht, kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (13000 UpM, 10 Min, 4 °C). 100 µl des plasmidhaltigen Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat enthielt, gemischt und für 30 Min bei -20 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation, bei der hauptsächlich die chromosomale DNA gefällt wird, wurde nochmals zentrifugiert (13000 UpM, 10 Min, 4 °C), wiederum 100 µl des Überstandes abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmide wurden mit 200 µl kaltem 100 % Ethanol gefällt, pelletiert (13000 UpM, 10 Min, 4 °C) und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in Volumina von 20 µl bis 50 µl H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen.

#### **4.13.5. Filtermethode zum Nachweis von β-Galaktosidase Enzymaktivität**

Das *lacZ*-Reportergen wird in vielen Assays verwendet, um Genaktivität visualisieren zu können. Das *lacZ*-Gen kodiert für die bakterielle β-Galaktosidase, welche die enzymatische Spaltung von Allolactose in Galaktose und Glukose katalysiert. Führt man dem System X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) zu, bewirkt das Enzym die Spaltung von X-Gal und als Spaltprodukt entsteht ein blauer Farbstoff.

Für den *lacZ*-Nachweis wurden Hefezellen mit einem kleinen Stück Filter (ca. 1 cm x 2 cm) von einer selektiven Platten mit Hilfe einer Pinzette abgehoben, bis annähernd auf der gesamten Fläche Hefezellen kleben blieben. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sek in flüssigem Stickstoff fixiert, um ein Aufbrechen der Zellwand zu erreichen. Danach wurden sie in einer Schale mit Reaktionspuffer (4.10.8.) getränkt und zwischen 2 und 12 Stunden bei RT bis zur gewünschten Farbentwicklung inkubiert.

#### 4.13.6. Immunpräzipitation von Proteinen aus Hefezellen

10 ml einer ÜNK, welche unter selektiven Bedingungen gewachsen ist, wurden in einem Endvolumen von 100 ml auf  $OD_{600}=0,2$  in selektivem Flüssigmedium verdünnt. Die Hefekultur wurde bis zu einer  $OD_{600}=0,8$  wachsen gelassen, anschließend zentrifugiert (3000 UpM, 3 Min, RT), der Überstand verworfen, die Hefezellen in kaltem Wasser in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert (3000 UpM, 3 Min, RT). Das Hefesediment wurde in 300 µl 2x BB-Puffer (100 mM Hepes pH 7,6, 200 mM Kalium-Acetat, 10 mM Magnesium-Acetat, 10 % Glycerol, 0,2 % Triton X-100, 0,2 mM PMSF, 10 µg / ml Aprotinin, 2 µM E-64, 2 µM Bestatin, 2 µM Pepstatin, 20 µM Leupeptin) und 200 µl Glas-Beads resuspendiert. Nachfolgende Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Hefe wurde für 4 x 3 Min mit Pausen von jeweils 3 Min gevortext, um das Aufbrechen der Hefezellen zu erreichen. Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 UpM, 10 Min, 4°C), der proteinhaltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 µl  $\alpha$ -myc Antikörper (Upstate, Clone 9E10, 1µg/µl) zugegeben. Danach wurde der Ansatz für eine Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, anschließend 20 µl Protein-G-Agarose, welche zuvor in 2x BB-Puffer äquilibriert wurden, zugegeben, nochmals für eine Stunde bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert und die Protein-G-Agarose durch Zentrifugation (1000 UpM, 2 Min, 4°C) präzipitiert. Nachfolgend wurde die Agarose mit je 1 ml 1x BB-Puffer 5-mal für 5 Min auf einem Drehrad bei 4°C gewaschen. Die Beads wurden zentrifugiert (1000 UpM, 2 Min, 4°C) und der Überstand mit einer Kanüle abgesaugt. 5 µl der Protein-G-Agarose wurden mit 5 µl 2x Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgekocht und durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-myc Antikörper 1:2000 und *anti*-Hop Antikörper 1:500, siehe 4.12.4.) analysiert.

#### 4.14. Methoden zur Haltung, Kreuzung und Präparation von *Drosophila melanogaster*

##### 4.14.1. Zubereitung von Fliegenfutter

Das Fliegenfutter wurde nach einem Rezept von C. Nüsslein-Vollhard (1977) zubereitet. Zunächst wurden 48g Agar (Serva) in 4,5 l Wasser durch Aufkochen gelöst. Danach wurden 110 g Trockenhefe, 60 g Sojamehl, 130 g Rübensirup, 480 g Malzextrakt und 480 g in 1 l kaltem Wasser gelöstes Maismehl zugegeben. Nach 30 minütigem Erhitzen bei geringer Wärmezufuhr wurde 14 g Nipagin (Methyl-4-Hydroxybenzoat Natriumsalz, Merck) zugegeben. Das Fliegenfutter wurde weitere 15 Min bei geringer Wärmezufuhr erhitzt und anschließend in Zuchbehälter (Greiner) gefüllt. Die zu ungefähr einem viertel mit Fliegenfutter gefüllten Röhrchen wurden bei RT inkubiert, bis das Fliegenfutter fest geworden war. Die Lagerung der Röhrchen erfolgte anschließend bei 4°C. Vor Gebrauch wurden die Röhrchen auf RT vorgewärmt.

#### **4.14.2. Haltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster***

Die Fliegenzucht erfolgte in Zuchtbehältern, die zur Fütterung der Fliegen mit etwas frischer Bäckerhefe versehen wurden. Je nach Anzahl der gewünschten Nachkommen wurden Zuchtbehälter unterschiedlicher Größe verwendet. Die Stammhaltung (bis ungefähr 50 Fliegen) erfolgte in kleinen Behältern von 16 ml Volumen, die Anzucht größerer Mengen an Fliegen oder Larven zur Präparation erfolgte in Zuchtbehältern von 175 ml Volumen. Die Zuchtbehälter wurden mit Polyurethan- (Ceaprenstopfen, Greiner) oder Wattestopfen verschlossen. Bei 18°C beträgt die Generationszeit von *Drosophila* etwa 21 Tage, bei 25°C hingegen 10-12 Tage. Bei 18°C gehaltene Fliegen wurden alle 4 Wochen in frische Futterröhrchen umgesetzt, bei 25 °C gehaltene Fliegen dagegen im Abstand von 2 Wochen.

#### **4.14.3. Sortieren von Fliegen**

Durch Behandlung mit CO<sub>2</sub> können Fliegen betäubt und unter Verwendung eines optischen Hilfsmittels (Binokular) nach Geschlecht und genetischen Markern sortiert werden. Weibchen lassen sich von Männchen folgendermaßen unterscheiden: Weibchen sind in der Regel größer als Männchen, ihr Hinterleib ist zugespitzt und hell, während die Männchen ein punktiertes Abdomen aufweisen, das abgerundet und dorsal dunkler erscheint als das weibliche Abdomen.

#### **4.14.4. Ansetzen von Kreuzungen**

Um Fliegen verschiedenen Genotyps miteinander zu kreuzen, wurden von einem der beiden Fliegenstämme jungfräuliche Weibchen gesammelt. Für das Sammeln von Jungfrauen wurden Fliegen des entsprechenden Stammes in frische Futterröhrchen überführt und bei 25°C vermehrt. Nach etwas 10 Tagen wurde die Elterngeneration aus den Futterröhrchen entfernt. Die frisch geschlüpften Weibchen der F1-Generation wurden von den Männchen getrennt und in frische Futterröhrchen bei 18°C aufbewahrt, bevor sie verpaart wurden.

Bei 18°C ist die Entwicklung der Fliegen verlangsamt, so dass ein Absammeln der Jungfrauen nur alle 12-17 Stunden notwendig war, um das Verpaaren der geschlüpften Fliegen zu verhindern. Je nach Anzahl der gewünschten Nachkommen erfolgten die Kreuzungen in kleinen oder großen Futterröhrchen. Zum Sammeln von Larven des dritten Entwicklungsstadiums erfolgte die Kreuzung der Fliegen jeweils in großen Futterröhrchen, wobei die Nachkommen ab dem ersten Larvenstadium täglich mit einer frischen Hefepaste (Trockenhefe mit Wasser angerührt) gefüttert wurden. Larven, welche zur Präparation der Hämozyten oder der Lymphdrüsen verwendet wurden, wurden entweder bei 18°C oder 23°C in einem Inkubator gehalten.

Die Anzahl der Männchen einer Kreuzung entsprach hierbei etwa einem Drittel der Anzahl der Weibchen.

#### 4.14.5. Sammeln von Larven des dritten Entwicklungsstadiums

Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden mit Hilfe eines optischen Hilfsmittels (Binokular) und unter Hilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge (510 nm, GFP) nach dem gewünschten Genotyp vorsortiert. Anschließend wurden die Larven mit Hilfe eines Binoklars mit Durchlichtvorrichtung nach Weibchen und Männchen sortiert. Männliche und weibliche Larven lassen sich folgendermaßen voneinander unterscheiden: die paarig lateral angeordneten Gonaden der Männchen sind wesentlich größer als die der Weibchen (ungefähr 5-10 fach).

Die sortierten Larven wurden in ein frisches Futterröhrchen mit frischer Hefepaste gesetzt und bis zur Präparation bei 18°C gehalten.

#### 4.14.6. Färbung der zirkulierenden Hämozyten von *Drosophila melanogaster*

Zur Visualisierung der zirkulierenden Hämozyten wurden die Blutzellen der verschiedenen Genotypen auf Glasplatten fixiert, anschliessend mit DAPI und einem blutzellspezifischen Antikörper gefärbt und danach mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden entsprechend ihres Genotyps gesammelt (siehe 4.14.5.), mehrmals mit Hilfe eines Siebs gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Die Larve wurde mittels zweier Präparierpinzetten (Marke Dumont #5) am posterioren Ende aufgeritzt, bis ein deutlicher Tropfen Hämolymphe sichtbar wurde (wichtig: Larve nicht am anterioren Ende festhalten, um die Lymphdrüse nicht zu beschädigen!). Hämolymphe in einen 5 µl Tropfen 1x PBS setzen, welcher zuvor auf ein Glasdeckgläschen gesetzt wurde, 10 min in einer Feuchtigkeitskammer inkubieren und anschließend für 3 Min in eiskaltem 0,5 % Glutaraldehyd fixieren. Danach einmal in kaltem 1x PBS waschen und 3 x 10 Min in kaltem 1x PBS + 2% BSA blocken. Die Inkubation mit dem anti-Hämozyten Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:25 in kaltem 1x PBS + 2% BSA über Nacht. Die Antikörperlösung wurde abgenommen, die Zellen 1 x 5 Min mit 1x PBS und 3 x 15 Min mit 1x PBS + 1% BSA bei RT gewaschen und für zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-IgG Alexa546-Konjugat 1:500) in 1x PBS + 1% BSA bei RT inkubiert.

Ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch 3 x 10 Min waschen mit 1x PBS entfernt. Die Zellen wurden 10 min mit DAPI (5µg/ml) inkubiert und anschließend wiederum für 3 x 10 Min mit 1x PBS gewaschen. Überschüssiges PBS tropfte vom Glasdeckgläschen ab. Präparate wurden in 90% Glycerol auf einem Objektträger eingebettet und mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert.



#### **4.14.7. Qualitative Zählung der zirkulierenden Hämozyten von *Drosophila melanogaster***

Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden entsprechend ihres Genotyps gesammelt (siehe 4.14.5.), mehrmals mit Hilfe eines Siebs gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Die Larve wurde mittels zweier Präparierpinzetten (Marke Dumont #5) am posterioren Ende aufgeritzt, bis ein deutlicher Tropfen Hämolymphe sichtbar wurde (wichtig: Larve nicht am anterioren Ende festhalten, um die Lymphdrüse nicht zu beschädigen!). Hämolymphe in einen 5 µl Tropfen 1x PBS setzen, welcher zuvor auf das Zählraster einer Neubauer Zählkammer pipettiert wurde. Anschliessend wurde das Deckgläschen vorsichtig aufgesetzt. Die Auszählung und Unterscheidung der zirkulierenden Hämozyten erfolgte anhand ihrer charakteristischen Morphologie mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Es wurden jeweils 1 mm<sup>2</sup> an Zellen gezählt, was einem Volumen bei der Kammertiefe von 0,1 mm 0,1 µl entspricht. Gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor 5 x 10.000 = Zellzahl pro ml.

#### **4.14.8. Präparation und DAPI Färbung der Lymphdrüsen von *Drosophila melanogaster***

*Drosophila* Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden entsprechend ihres Genotyps sortiert (siehe 4.14.5.), in Wasser gespült und zur Präparation in einen Tropfen 1x PBS auf eine schwarzen flexiblen Gummiunterlage gelegt. Die Präparation erfolgte unter einem Binokular mit Pinzetten der Marke Dumont #5. Die Larve wurde auf den Rücken gedreht und mit Insektennadeln (Ø 0,1 mm) auf der Gummiunterlage fixiert. Die erste Nadel wurde anterior direkt hinter dem Mundhaken angebracht, die zweite so weit wie möglich am posterioren Ende, ohne hierbei die inneren Organe der Larve zu schädigen. Danach wurde die Kutikula der Larve entlang einer gedachten Mittellinie geöffnet und wiederum mit jeweils zwei Insektennadeln fixiert. Alle Organe ausser dem Gehirn, dem Herz und der darauf liegenden Lymphdrüse wurden entfernt. Die verbleibenden Gewebe wurden auf der Gummiunterlage mit 0,5 % Glutaraldehyd für 10 Min fixiert, 2 x 5 Min mit 1x PBS gewaschen und 10 Min mit DAPI (5µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde nochmals kurz mit 1x PBS gewaschen, die verbleibenden Organe von der Kutikula abgehoben und auf einen Objektträger mit einem Tropfen 90% Glyzerol gelegt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer computergesteuerten Kamera.

## 4.15. Expression und Reinigung rekombinanter Proteine in bzw. aus *Sf9*-Zellen

Alle Hop-Proteine wurden mit Hilfe des Baculovirussystems als NH<sub>2</sub>-terminale Flag- und COOH-terminale 6xHis-markierte Fusionsproteine in *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)-Zellen exprimiert. Cdc2-Protein wurde mit diesem System als NH<sub>2</sub>-terminales GST-Flag-markiertes Fusionsprotein und Stat92e als NH<sub>2</sub>-terminales Flag-markiertes Fusionsprotein exprimiert.

Die *Sf9*-Zellen wurden als Suspensionskultur in einem „Spinner“ in serumhaltigen Medium (SF900 II-Medium, 1 % Pluronic F-68, 1 % L-Glutamin 200 mM, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % Foetal Bovine Serum, Gibco) kultiviert. Zur Primärtransfektion, der Herstellung der rekombinanten Baculoviren, wurden 10<sup>6</sup> *Sf9*-Zellen in einer Kavität einer 6-Kavitäten-Zellkulturplatte ausgesät. Lösung A (175 ng Baculo-DNA, 1,3-1,5 µg Transferplasmid, 33 µl Medium serumfrei (SF900 II-Medium, 1 % Pluronic F-68, 1 % L-Glutamin 200 mM, 1 % Penicillin/Streptomycin, Gibco)) und Lösung B (10 µl Lipofectin Reagent, 23 µl SF900-Medium, Gibco) wurden einzeln angesetzt, gemischt (Lösung AB) und 15-45 min inkubiert. Die abgesetzten *Sf9*-Zellen wurden dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Lösung AB wurde in 440 µl serumfreies Medium aufgenommen und auf die *Sf9*-Zellen gegeben. Die *Sf9*-Zellen wurden mit der Transfektionslösung 15 h auf einer Wippe bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde abgenommen, die *Sf9*-Zellen mit serumhaltigen Medium gewaschen und mit 2 ml serumhaltigen Medium für 5 Tage bei 27 °C stehend inkubiert. Danach wurde der virenhaltige Überstand abgenommen und für die Virenampifizierung verwendet, da der Virustiter des Überstandes noch zu gering für die Proteinexpression ist.

### 4.15.1. Amplifizierung und Reamplifizierung rekombinanter Baculoviren

Für die Amplifizierung wurden 10<sup>7</sup> *Sf9*-Zellen auf einer 10 cm Zellkulturplatte ausgesät und absetzen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen. Auf die *Sf9*-Zellen wurden 2,5 ml serumhaltiges Medium und 1 ml Überstand der Primärtransfektion gegeben und für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden 10 ml serumhaltiges Medium zugegeben und die Platte für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert (2000 UpM, 5 Min, 4 °C) und für einen weiteren Virusamplifizierungsschritt, der Reamplifizierung, verwendet.

Für die Reamplifizierung wurden 2,5 × 10<sup>7</sup> *Sf9*-Zellen auf einer 15 cm Zellkulturplatte ausgesät. Der Überstand wurde abgenommen. Auf die *Sf9*-Zellen wurden 5 ml serumhaltiges Medium und 50-250 µl des Amplifizierungsüberstandes gegeben und für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden 15 ml serumhaltiges Medium zugegeben und die Platte für 5 Tage bei 27 °C stehend inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert (2000 UpM, 5 Min, 4 °C) und bei 4 °C aufbewahrt. Mit diesem Überstand konnte die Proteinexpression durchgeführt werden.

#### 4.15.2. Proteinexpression in Sf9-Zellen

Für die Proteinexpression wurden Sf9-Zellen bei einer Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Es wurden jeweils Expressionskulturen von 500 ml in 5 L-Kolben ohne Schikane angesetzt. Der Kultur wurden 1/25 des Volumens Virus-Reamplifizierungsüberstand zugegeben. Die Expressionskultur schüttelte mit 70 UpM für einen Tag bei 27 °C für alle Hop-Proteine und für zwei Tage für die Cdc2 und Stat92e-Proteine.

#### 4.15.3. Reinigung Flag-markierter Proteine aus Sf9-Zellen

Die Sf9-Zellen wurden zentrifugiert (2000 UpM, 10 Min, 4 °C) und in 30 ml 0,2 M NaCl-HEMG (0,2 M NaCl, 25 mM Hepes, pH 7,6, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin), 0,1 % NP-40, 0,2 mM PMSF pro 500 ml Expressionskultur resuspendiert. Die Suspension wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde auf Eis sonifiziert (kleine Spitze, 40-60 % Intensität, 3 × 15 sek), zentrifugiert (SS34, 18000 UpM, 45 Min, 4 °C) und der Überstand mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert. Zur Reinigung der Flag-markierten Proteine wurde Anti-Flag M2-Agarose (M2-Agarose, Sigma) verwendet. Etwa 100 µl der M2-Agarose wurden, nachdem sie in 0,2 M NaCl-HEMG äquilibriert worden waren, pro 10 ml des Filtrats üN bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde die M2-Agarose, an die Flag-markiertes Protein gebunden war (Protein-M2-Agarose), 3 × 10 Min auf dem Drehrad mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 0,2 mM PMSF, 2 × 10 Min mit 0,5 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 0,2 mM PMSF und 1 × 10 Min mit 0,2 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 0,2 mM PMSF gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Protein-M2-Agarose zentrifugiert (2000 UpM, 2 Min, 4 °C) und der Überstand mit einer Kanüle oder Pasteurpipette abgesaugt. 5-10 µl der Protein-M2-Agarose wurde mit 10 µl 2× Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgeköcht und durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließender Coomassiefärbung (siehe 4.12.1.) analysiert.

Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von 0,5 ml einer Flag-Peptid Lösung (10 mg / ml Flag-Peptid in 0,5 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40) für eine Stunde bei RT eluiert. Die eluierten Proteine wurden 1:10 mit 0 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 verdünnt und für 4 Stunden bei RT mit 200 µl Q-Sepharose (Anionenaustauscher) Beads, welche zuvor in 0,05 mM NaCl-HEMG, 1 % NP-40 äquilibriert wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Q-Sepharose Beads auf eine Polypropylensäule (BioRad) gegeben und mit 10 Volumen 0,05 M NaCl-HEMG 1 % NP-40 gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch einen Stufengradienten über 5 ml von 100 mM auf 1 M NaCl-HEMG Puffer eluiert, wobei Fraktionen von 0,2 ml gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-Flag Antikörper 1:2000, siehe 4.12.4.) analysiert.

#### 4.15.4. Reinigung des GST-Flag-markierten Proteins aus Sf9-Zellen

Die Zellen wurden zentrifugiert (2000 UpM, 10 Min, 4 °C) und in 30 ml GST-Lysepuffer (0,2 M NaCl-HEMG, 10 mM DTT, 0,1 % NP-40, 0,2 mM PMSF) pro 500 ml Expressionskultur resuspendiert. Die Suspension wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde auf Eis sonifiziert (kleine Spitze, 40-60 % Intensität, 3 x 15 sec), zentrifugiert (SS34, 18000 UpM, 45 Min, 4 °C) und der Überstand mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert. Zur Reinigung der GST-Flag markierten Proteine wurde der Proteinextrakt für 4 Stunden bei 4 °C mit 1 ml Glutathion-Sepharose Fast-Flow Beads, welche zuvor in GST-Lysepuffer äquilibriert wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sepharose Beads auf eine Polypropylensäule (BioRad) gegeben und mit 10 Säulenvolumen 0,2 M NaCl-HEMG, 0,1 % NP-40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch 4 x 0,5 ml GST-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 0,1 % NP-40, 10 mM Glutathion, 0,2 mM PMSF) eluiert. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.12.4.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-Flag Antikörper 1:2000 und *anti*-GST Antikörper 1:2000, siehe 4.12.3.) analysiert.

Die eluierten Proteine wurden 1:10 mit 0 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 verdünnt und für 4 Stunden bei RT mit 200 µl Q-Sepharose (Anionenaustauscher) Beads, welche zuvor in 0,05 mM NaCl-HEMG, 1 % NP-40 äquilibriert wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Q-Sepharose Beads auf eine Polypropylensäule (BioRad) gegeben und mit 10 Volumen 0,05 M NaCl-HEMG 1 % NP-40 gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch einen Stufengradienten über 5 ml von 100 mM auf 1 M NaCl-HEMG Puffer eluiert, wobei Fraktionen von 0,2 ml gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-Flag Antikörper 1:2000, siehe 4.12.4.) analysiert.

Zur weiteren Reinigung und Anreicherung des proteins wurden etwa 100 µl M2-Agarose, nachdem sie in 0,5 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 äquilibriert worden waren, mit den Proteinfractionen üN bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde die M2-Agarose, an die GST-Flag-markiertes Protein gebunden war (Protein-M2-Agarose), 5 x 10 Min auf dem Drehrad mit 1 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 2 x 10 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 1 x 5 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxycholat und 1 x 5 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Protein-M2-Agarose zentrifugiert (2000 UpM, 2 Min, 4 °C) und der Überstand mit einer Kanüle oder Pasteurpipette abgesaugt. 5 µl der Protein-M2-Agarose wurde mit 5 µl 2x Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgekocht und durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-Flag Antikörper 1:2000, siehe 4.12.4.) analysiert.

#### 4.15.5. Reinigung der NH<sub>2</sub>-terminal-Flag und COOH-terminal-6xHis markierten Proteine aus *Sf9*-Zellen

Die Zellen wurden zentrifugiert (2000 UpM, 10 Min, 4 °C) und in 30 ml His-Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,6, 0,8 M NaCl, 10 % Glyzerol, 0,1 % NP-40, 10 mM Imidazol, 0,2 mM PMSF, 5 µg / ml Aprotinin, 1 µM E-64, 1 µM Bestatin, 1 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin) pro 500 ml Expressionskultur resuspendiert. Die Suspension wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde auf Eis sonifiziert (kleine Spitze, 40-60 % Intensität, 3 x 15 sec), zentrifugiert (SS34, 18000 UpM, 45 Min, 4 °C) und der Überstand mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert.

Danach wurde zuerst die Reinigung mittels COOH-terminalen 6xHis-Tag durchgeführt. Zur Reinigung der 6xHis-markierten Proteine wurde der Proteinextrakt über Nacht bei 4 °C mit 1 ml Qiagen Ni-NTA Superflow Beads, welche zuvor in His-Lysepuffer äquilibriert wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Qiagen Ni-NTA Superflow Beads auf eine Polypropylensäule (BioRad) gegeben und mit 10 Säulenvolumen His-Puffer (50 mM Hepes pH 7,6, 0,8 M NaCl, 10 % Glyzerol, 0,1 % NP-40, 0,2 mM PMSF, 5 µg / ml Aprotinin, 1 µM E-64, 1 µM Bestatin, 1 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin) + 20 mM Imidazol gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch einen Stufengradienten über 25 ml von 50 mM auf 500 mM Imidazol in His-Puffer eluiert, wobei jeweils nur eine Fraktion von 5 ml gesammelt wurde. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (anti-Flag Antikörper 1:2000 und anti-His Antikörper 1:2000, siehe 4.12.4.) analysiert.

Fraktionen, welche den Hauptanteil der NH<sub>2</sub>-terminal-Flag und COOH-terminal-6xHis markierten Protein enthielten, wurden vereinigt. Etwa 100 µl M2-Agarose wurden, nachdem sie in 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 äquilibriert worden waren, mit den Proteinfraktionen üN bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde die M2-Agarose, an die Flag-markiertes Protein gebunden war (Protein-M2-Agarose), 5 x 10 Min auf dem Drehrad mit 1 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 2 x 10 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 1 x 5 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxycholat und 1 x 5 Min mit 0,8 M NaCl-HEMG, 1 % NP-40 gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Protein-M2-Agarose zentrifugiert (2000 UpM, 2 Min, 4 °C) und der Überstand mit einer Kanüle oder Pasteurpipette abgesaugt. 5 µl der Protein-M2-Agarose wurde mit 5 µl 2x Proteingelprobenpuffer versetzt, aufgeköcht und durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) mit anschließendem Western-Blot (*anti*-Flag Antikörper 1:2000 und *anti*-Hop Antikörper 1:100, siehe 4.12.4.) analysiert.

#### 4.16. *In vitro* Kinase-Assay

Bei denen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kinasen handelt es sich um gereinigte Hop-Proteine. Als Substrate wurden die Proteine Cdc2, CG17033, CG2944 und als Phosphatgruppendonator wurde  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP benutzt.

Für die Untersuchungen der Phosphorylierung der Substrate durch Hop wurden 5-10  $\mu\text{l}$  der Hop-M2-Agarose (4.16.5.) mit 5-10  $\mu\text{l}$  der Substrate und 1  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP gemischt und der Reaktionsansatz mit 1x Kinasepuffer (25 mM Hepes pH 7,6, 12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,8 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 % NP-40, 10 mM DTT, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0,2 mM PMSF, 5  $\mu\text{g}$  / ml Aprotinin, 1  $\mu\text{M}$  E-64, 1  $\mu\text{M}$  Bestatin, 1  $\mu\text{M}$  Pepstatin, 10  $\mu\text{M}$  Leupeptin) auf 40  $\mu\text{l}$  Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde, wenn nicht anderst angegeben, bei 30 °C für eine Stunde inkubiert. Durch Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  4x Proteinprobenpuffer wurde die Reaktion gestoppt, für 5 Min bei 100 °C gekocht, die M2-Agarose durch Zentrifugation (13000 UpM, 5 Min, RT) pelletiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel (siehe 4.12.3.) aufgetragen. Anschliessend wurden die nach Molekulargewicht getrennten Proteine mit Silber gefärbt (siehe 4.12.2.), das Proteingel getrocknet und die Phosphorylierung mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Exposition der Röntgenfilme (X-OMAT AR-5, Amersham Pharmacia) erfolgte zwischen einem und fünf Tagen bei -80 °C.

#### 4.17. *In vitro* Protein-Protein Interaktions-Assay

Je 5-10  $\mu\text{l}$  der gereinigten Hop-M2-Agarose Proteine (M2-Agarose inkubiert mit nicht transfiziertem *Sf9* Extrakt als Negativkontrolle) wurden unmittelbar für die Interaktionsansätze verwendet. Die *cdc2*-, *cg17033*- und *cg2944*-Konstrukte wurden in pT $\beta$ Stop kloniert und mit dem „TNT T7 coupled transcription-translation reticulocyte lysate system“ (Promega) in Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin *in vitro* exprimiert. Aus diesen Ansätzen wurden 5  $\mu\text{l}$  in 500  $\mu\text{l}$  NETN (20 mM Tris, pH 8, 0,1 % NP-40, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,2 mM PMSF) 1:100 verdünnt und die M2-Agarose mit den immobilisierten Proteinen zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proteinmatrix wurde anschließend 5x mit 1 ml NETN gewaschen und in Proteingelprobenpuffer für 5 Min gekocht. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.12.3.) getrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde mit Amplify (Amersham Pharmacia) behandelt, getrocknet und die Interaktion mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Exposition der Röntgenfilme (X-OMAT AR-5, Amersham Pharmacia) erfolgte zwischen einem und zwei Tagen bei RT.

## 5. Abkürzungen

AA	Acrylamid
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AK	Antikörper
$\alpha$	„Anti“ im Zusammenhang mit Antikörper
<i>amp<sup>R</sup></i>	Gen für das Enzym $\beta$ -Lactamase
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindungsdomäne
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Albumin aus Rinderseren
Ci	Curie
cm	Centimeter
CyO	„Curly of Oster“
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
fl	full length, volllängen
FM7i	„First Multiple 7i“
for	forward
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
His	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für das Enzym $\beta$ -Galaktosidase
LB	Luria Broth
Leu	Leucin

---

LiAc	Lithiumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	molar
mA	Milliampere
mCi	Millicurie
μCi	Mikrocurie
min	Minute
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mmol	Millimol
μmol	Mikromol
mRNA	messenger RNA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxyd
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
ng	Nanogramm
Ni <sup>2+</sup>	zweiwertiges Nickelion
Nipagin	Methyl-4-Hydroxybenzoat Natriumsalz
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NP40	Nonident P40
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
rev	revers
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zelllinie 9
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
TBE	Tris-gepufferte Salzlösung mit EDTA-Zusatz
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 Zusatz
TEMED	N, N, N', N'-Triethylmethylethylendiamin
TM3	„Third Multiple 3“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan



Trp	Tryptophan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit, Einheit
üN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsvolumenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YTHS	Yeast Two Hybrid Screen

## 6. Literatur

- Adkins, J. N. und Lumb, K. J. (2000). Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21 (Cip1/Waf1). *Biochemistry* **39**, 13925-13930.
- Aggarwal, B. B., Shishoida, S., Ashikawa, K., Bharti, A. C. (2002). The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr. Grud Targets Inflamm. Allergy* **1**, 327-342.
- Aktas, H., Cai, H., Cooper, G. M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the cdk inhibitor p27<sup>Kip1</sup>. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3850-3857.
- Albaneses, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. (1995). Transforming p21<sup>ras</sup> mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promotor through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* **270**, 23589-23597.
- Alfonso, T. B. und Jones, B. W. (2002). gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **248**, 369-383.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., Dearolf, C. R. (2003). Analysis of ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* **163**, 203-215.
- Banerjee, A., Banks, A. S., Nawijn, M. C., Chen, X. P., Rothman, P. B. (2002). Cutting edge: Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits activation of NFATp. *J. Immunol.* **168**, 4277-4281.
- Baired, A. M., Lucas, J. A., Berg, L. J. (2000). A profound deficiency in thymis progenitor cells in mice lacking Jak3. *J. Immunol.* **165**, 3680-3688.
- Basset, A., Khush, R., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A., Lemaitre, B. (2000). The phytopathogenis bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3376-3381.
- Bates, S., Bonetta, L., Macallan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSKJ3) are a distinct subset of the cyclin dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* **9**, 71-79.
- Beccari, S., Teixeira, L., Rorth, P. (2002). The JAK/STAT pathway is required for border cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* **111**, 115-123.
- Bernardoni, R., Vivancos, V., Giangrande, A. (1997). *glide/gcm* is expressed and rewired in the scavenger cell lineage. *Development* **191**, 118-130.
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., Darnell, J. E. (2001). A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates *stat92E*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9563-9568.

- Binari, R., Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* **8**, 300-312.
- Bischoff, F. R., Goerlich, D. (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin-beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett.* **419**, 249-254.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* **14**, 705-715.
- Bischoff, J. R. und Plowman, G. D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* **9**, 454-459.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Parker, M., Kress, M., Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159-1169.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 64-76.
- Botz, J. K., Zerfass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Votg, B., Eileres, M. (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3401-3409.
- Braun, A., Hoffmann, J. A., Meister, M. (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in *domino* mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14337-14342.
- Brown, S., Hu, N., Castelli-Gair Hombria, J. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Curr. Biol.* **11**, 1700-1705.
- Bubbard, S. R., Mohammadi, M., Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 11987-11990.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329-344.
- Callus, B. A. und Mathey-Prevot, B. (2002). SOCS36E, a novel *Drosophila* SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signaling in the imaginal wing disc. *Oncogene* **21**, 4812-4821.
- Cao, Z., Henzel, W. J., Gao, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* **271**, 1128-1131.
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H., Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**, 979-992.

- Castelli-Gair Hombria, J. und Brown, S. (2002). The fertile field of *Drosophila* JAK/STAT signaling. *Curr. Biol.* **12**, R569-R575.
- Chen, H. W., Chen, X., Oh, S. W., Marrinissen, M. J., Gutkind, J. S., Hou, S. X. (2002). *mom* identifies a receptor for the *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes Dev.* **16**, 388-398.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D., Dutta, A. (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4673-4682.
- Cherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., Fields, S. (1991). The two-hybrid-system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578-9582.
- Cho, N. K., Keyes, L., Johnson, E., Heller, J., Ryner, L., Karim, F., Krasnow, M. A. (2002). Developmental control of blood cells migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* **108**, 865-876.
- Chong, M. M., Cornish, A.L., Darwiche, R., Stanley, E. G., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Hilton, D. J., Starr, R., Alexander, W. S., Kay, T. W. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Immunity* **18**, 475-487.
- Clemens, M. J. und Bommer, U. A. (1999). Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**, 1-23.
- Cline, T. W. und Meyer, B. J. (1996). Vive la difference: males vs. females in flies vs. worms. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 637-702.
- Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M., Roberts, J. M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* **10**, 1979-1990.
- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C. (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 25733-25741.
- Cohney, S. J., Sanden, D., Cacalano, N. A., Yoshimura, A., Mui, A., Migone, T. S., Johnston, J. A. (1999). SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4980-4988.
- Cook, M. A. und Tyers, M. (2004). Cellular differentiation: the violin strikes up another tune. *Curr. Biol.* **14**, R11-R13.

- Cornish, A. L., Davey, G. M., Metcalf, D., Purton, J. F., Corbin, J. E., Greenhalgh, C. J., Darwiche, R., Wu, L., Nicola, N. A., Godfrey, D. I., Heath, W. R., Hilton, D. J., Alexander, W. S., Starr, R. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 has IFN-gamma-independent actions in T cell homeostasis. *J. Immunol.* **170**, 878-886.
- Corwin, H. O. und Hanratty, W. P. (1976). Characterization of a unique lethal tumorous mutation in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* **144**, 345-347.
- Darnay, B., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activating NF- $\kappa$ B (RANK): interaction with TNF-receptor associated factor (TRAF)s and activation of NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20551-20555.
- Darnay, B., Ni, J., Moore, P. A., Aggarwal, B. B. (1999). Activation of NF- $\kappa$ B by RANK requires TRAF6 and NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK): identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 7724-7731.
- Dearolf, C. R. (1998). Fruit fly "leukemia". *Biochem. Biophys. Acta* **1**, M13-M23.
- DeBenedetti, A. und Harris, A. L. (1999). eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 59-72.
- De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S. (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev. Cell* **3**, 581-592.
- Dell'Albani, P., Santangelo, R., Torrisi, L., Nicoletti, V. G., Giuffrida Stella, A. M. (2003). Role of the JAK/STAT signal transduction pathway in the regulation of gene expression in CNS. *Neurochem. Res.* **28**, 53-64.
- Desai, D., Wessling, H. C., Fisher, R. P., Morgan, D. O. (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by cdc2 and cdk2. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 345-350.
- Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D., Goldmann, R. (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylated the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **112**, 523-533.
- Devault, A., Martinez, A. M., Fresquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., Doree, M. (1995). MAT-1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *EMBO J.* **14**, 5027-5036.
- Dvir, A., Conaway, J. W., Conaway, R. C. (2001). Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Cur. Opin. Genet. Dev.* **11**, 209-214.
- Dolphin, A. C. (2003). G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* **55**, 607-622.

- Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M., Franza, B. R., Karsenti, E., Draetta, G. (1991). Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J.* **10**, 3311-3319.
- Duhe, R. J. und Farrar, W. L. (1998). Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**, 1-15.
- Dulic, V., Lees, E., Reed, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-2 phase protein kinase. *Science* **257**, 1958-1961.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M., Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Current Biol.* **12**, 1923-1927.
- Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Zhang, M., Mahdi, R. M., Kim, S. J., Gery, I. (2002). Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J. Immunol.* **168**, 3181-3187.
- Ekengren, S. und Hultmark, D. (1999). *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 965-972.
- Elledge, S. J., Richman, R., Hall, F. L., Williams, R. T., Lodgson, N., Harper, J. W. (1992). Cdk2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2907-2911.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biol.* **10**, 781-784.
- Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Komiya, S., Yoshimura, A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits Jak kinases. *Nature* **387**, 921-924.
- Feng, J., Witthun, B. A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I. M., Ihle, J. N. (1997). Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2497-2501.
- Ferby, I., Blazquez, M., Palmer, A., Eritja, R., Nebreda, A. R. (1999). A novel p34<sup>cdc2</sup>-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* **13**, 2177-2189.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669-679.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fisher, R. P. und Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell* **78**, 713-727.

- Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* **83**, 47-57.
- Fossett, N., Tevosian, S. G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S. H., Schulz, R. A. (2001). The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1 and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7342-7347.
- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**, 431-443.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. B., White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**, 1991-1994.
- Frantsve, J., Schwaller, J., Sternberg, D. W., Kutok, J., Gilliland, D. G. (2001). Socs-1 inhibits Tel-Jak2 mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of Jak2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3547-3575.
- Galan, J. M. und Peter, M. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9124-9129.
- Garrett, S., Barton, W. A., Knights, R., Jin, P., Morgan, D. O., Fisher, R. P. (2001). Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 88-99.
- Gauzzi, M. C., Barbieri, G., Richter, M. F., Uze, G., Ling, L., Fellous, M. (1997). The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon  $\alpha$  receptor 1, a component of the interferon  $\alpha/\beta$  receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11839-11844.
- Geng, Y., Eaton, E. N., Picon, M., Robers, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**, 1173-1180.
- Ghiglione, C., Devergne, O., Georgenthum, E., Carballes, F., Medioni, C., Cerezo, D., Noselli, S. (2002). The *Drosophila* cytokine receptor Domeless controls border cell migration and epithelial polarization during oogenesis. *Development* **129**, 5437-5447.
- Giet, R. und Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.* **112**, 3591-3601.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* **42**, 611-643.
- Girault, J. A., Labesse, G., Momon, J. P., Callebaut, I. (1999). The N-termini of JAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 54-57.

- Glover, D. M., Hagan, I. M., Tavares, A. A. M. (1998). Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* **12**, 3777-3787.
- Gobert, S., Chretin, S., Gouilleux, F., Muller, O., Pallard, C., Dussanter-Fourt, I. (1996). Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *EMBO J.* **10**, 2434-2441.
- Gould, K. L. und Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45.
- Greenlund, A. C., Farrar, M. A., Viviano, B. L., Schreiber, R. D. (1994). Ligand-induced INF gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* **13**, 1591-1600.
- Gu, Y., Rosenblatt, J., Morgan, D. O. (1992). Cell cycle regulation of Cdk2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11**, 3995-4005.
- Gupta, T. und Schüpbach, T. (2001). Two signals are better than one: border cell migration in *Drosophila*. *Dev. Cell* **1**, 443-445.
- Hagopain, J. C., Kirtley, M. P., Stevenson, L. M., Gergis, R. M., Russo, A. A., Pavletich, N. P. (2001). Kinetic basis for activation of cdk2/cyclinA by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 275-280.
- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., Pines, J. (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* **17**, 4127-4138.
- Hannon, G. J., Casso, C., Beach, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1731-1735.
- Hanratty, W. P. und Ryerse, J. S. (1981). A genetic melanotic neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **83**, 238-249.
- Haridas, V., Shrivastava, A., Su, J., Yu, G. L., Ni, J., Liu, D., Chen, S. F., Ni, Y., Ruben, S. M., Gentz, R., Aggarwal, B. B. (1999). VEGI, a new member of the TNF family activates nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase and modulates cell growth. *Oncogene* **18**, 6496-6504.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P. (1995). Inhibition by cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* **6**, 387-400.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993). The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potential inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Harrison, D. A., Binari, R., Nahreini, T. S., Gilman, M., Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus Kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J.* **14**, 2857-2865.



- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., Perrimon, N. (1998). *Drosophila unpaired* encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 3252-3263.
- Hartenstein, V. und Jan, Y. N. (1992). Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **201**, 194-220.
- Hatakeyama, M., Brill, J. A., Fink, G. R., Weinberg, R. A. (1994). Colaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* **8**, 1759-1771.
- Hengst, L. und Reed, S. (1998). Complete inhibition of cdk/cyclin by one molecule of p21<sup>Cip1</sup>. *Genes Dev.* **12**, 3882-3888.
- Heuvel, S. van den und Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**, 2050-2054.
- Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobel, B., Bates, B. A., Behrmann, I., Kerr, I. M. (2001). A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett.* **505**, 87-91.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box from five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 114-119.
- Hindley, A. und Kolch, W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J. Cell Sci.* **115**, 1575-1581.
- Hinds, P. W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**, 993-1006.
- Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human Cdc25C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* **12**, 53-63.
- Hoffmann, I., Draetta, G., Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G<sub>1</sub>/S transition. *EMBO J.* **13**, 4302-4310.
- Hoffmann, J. A. und Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* **3**, 121-126.
- Honda, R., Ohba, Y., Nagata, A., Okayama, H., Yasuda, H. (1993). Dephosphorylation of human p34<sup>cdc2</sup> kinase of both Thr-14 and Tyr-15 by human Cdc25B phosphatase. *FEBS Lett.* **318**, 331-334.

- Hou, S. X., Melnick, M. B., Perrimon, N. (1996). *marelle* acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* **84**, 411-419.
- Hou, S. X. und Perrimon, N. (1997). The JAK-STAT pathway in *Drosophila*. *Trends Genet.* **13**, 105-110.
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X., Perrimon, N. (2002). The JAK/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev. Cell* **3**, 765-778.
- Huang, L. J., Constantinescu, S. N., Lodish, H. F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell* **8**, 1327-1338.
- Ihle, J. N. (1995). The janus protein tyrosine kinase family and its role in the cytokine signaling. *Adv. Immunol.* **60**, 1-35.
- Ihle, J. N. und Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**, 69-74.
- Ilangumaran, S., Ramanathan, S., La Rose, J., Poussier, P., Rottapel, R. (2003). Suppressor of cytokine signaling 1 regulates IL-15 receptor signaling in CD8<sup>+</sup>CD44<sup>HIGH</sup> memory T lymphocytes. *J. Immunol.* **171**, 2435-2445.
- Imada, K. und Leonard, W. J. (2000). The Jak-Stat pathway. *Mol. Immunol.* **37**, 1-11.
- Imler, J. L. und Hoffmann, J. A. (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **11**, 304-311.
- Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W. (1999). Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12436-12441.
- Jaenisch, R. und Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**, 245-254.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurtwitz, J., Massague, J. (1995). Mechanism of CDK activation by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.
- Jiang, H., Chou, H. S., Zhu, L. (1998). Requirement of cyclin E-cdk2 inhibition in p16<sup>INK4a</sup>-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5284-5290.
- Jinks, T. M., Polydorides, A. D., Calhoun, G., Schedl, P. (2000). The JAK/STAT signaling pathway is required for the initial choice of sexual identity in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell* **5**, 581-587.

- Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M. (2001). The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of Tel-Jak2. *J. Biol. Chem.* **276**, 12530-12538.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W. G. jr., Conaway, R. C. (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* **12**, 3872-3881.
- Kamura, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O. (1999). RBX1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**, 657-661.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau tumor-suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10430-10435.
- Kato, J. Y., Takahashi, H., Takahashi, Y., Matsushime, H. (1997). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**, 4878-496.
- Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2 deficient mice. *Immunity* **13**, 549-560.
- Karaiskou, A., Perez, L. H., Ferby, I., Ozon, R., Jesus, C., Nebreda, A. R. (2001). Differential regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and cyclins. *J. Biol. Chem.* **276**, 36028-36034.
- Karsten, P., Hader, S., Zeidler, M. P. (2002). Cloning and expression of *Drosophila* SOCS36E and its potential regulation by the JAK/STAT pathway. *Mech. Dev.* **117**, 343-346.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Strom, D. K., Sherr, C. J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (Cdk4) by Cdk-activating kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2713-2721.
- Keryer, G., Celati, C., Klotz, C. (1995). In isolated human centromeres, the associated kinases phosphorylate a specific subset of centromeral proteins. *Biol. Cell* **84**, 155-165.
- Kiger, A. A., Jones, D. L., Schulz, C., Rogers, M. B., Fuller, M. T. (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* **294**, 2542-2545.
- Kobayashi, H., Minshull, J., Ford, C., Golsteyn, R., Poon, R., Hunt, T. (1991). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J. Cell. Biol.* **114**, 755-765.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J. W., Elledge, S. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**, 1689-1694.

- Kong, M., Barnes, E. A., Ollendorff, V., Donoghue, D. J. (2000). Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J.* **19**, 1378-1388.
- Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C. A., Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionary conserved intermediated in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* **13**, 2059-2071.
- Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T., Hewport, J. (1994). Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 273-282.
- Krek, W. und Nigg E. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10**, 305-316.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* **11**, 847-862.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **230**, 243-257.
- Lanzafame, A. A., Christopoulos, A., Mitchelson, F. (2003). Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **9**, 241-260.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for *in vivo* Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev.* **12**, 370-381.
- Larochelle, S., Chen, J., Knights, R., Pandur, J., Morcillo, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Suter, B., Fisher, R. P. (2001). T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex *in vivo* and regulates its CTD kinase activity. *EMBO J.* **20**, 3749-3759.
- Lavoie, J. N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44<sup>MAPK</sup> and negatively by the p38/HOG<sup>MAPK</sup> pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 20608-20616.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**, 146-149.
- Lebestky, T., Jung, S. H., Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev.* **17**, 348-353.
- Lee, C. W., Reimer, C. L., Fang, L., Iruela-Arispe, M. L., Aaronson, S. A. (2000). Overexpression of kinase-associated phosphatases (KAP) in breast and prostate cancer and inhibition of the transformed phenotype by antisense KAP expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1723-1732.

- Lehman, R. (2001). Cell migration in invertebrates: clues from border and distal tip cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 457-463.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of *dorsal* during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* **14**, 536-545.
- Lengyel, J. A., Iwaki D. D. (2002). It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev. Biol.* **243**, 1-19.
- Leo, E., Welsh, K., Matsuzawa, S., Zapata, J. M., Kitada, S., Mitchell, R., Ely, K., Rde, J. (1999). Differential requirements for tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins in CD40-mediated induction of NF-kappaB and Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 22414-22474.
- Li, J., Meyer, A. N., Donoghue, D. J. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and it is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 502-507.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M. (2002). A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defense of *Drosophila*. *EMBO J.* **14**, 1412-1420.
- Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M., Krek, W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev.* **13**, 1822-1833.
- Liu, K. D., Gaffen, S. L., Goldsmith, M. A., Greene, W. C. (1997). Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differently regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr. Biol.* **7**, 817-826.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine14 and localizes to the endoplasmatic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.* **17**, 571-583.
- Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C. E., Piwnica-Worms, H. (1999). Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-Cyclin B1 complexes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5113-5123.
- Liu, H., Su, Y. C., Becker, E., Treisman, J., Skolnik, E. Y. (1999). A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds Ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr. Biol.* **9** 101-104.
- Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K., Wilson, I. A. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-990.
- Locksley, R. M., Killeen, N., Leonadro, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.

- Lomaga, M., Yeh, W. C., Sarosi, I., Duncan, G., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J., Paige, C., Lacey, D., Dunstan, C., Boyle, W., Goeddel, D. V., Mak, T. (1999). TRAF6 deficiency results in osteoporosis and defective interleukin-1, CD40 and LPS signaling. *Genes Dev.* **13**, 1015-1024.
- Long, J. J., Leresche, A., Kriwacki, W., Gottesfeld, J. M. (1998). Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1467-1476.
- Lowenberger, C. (2001). Innate immunity response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 219-229.
- Luo, H., Hanratty, W. P., Dearolf, C. R. (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila hop<sup>Tum-l</sup>* causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO* **14**, 1412-1420.
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., D'Andrea, A. D., Dearolf, C. R. (1997). Mutation in the JAK kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian JAK-STAT pathways. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1562-1571.
- Luo, H., Asha, H., Kockel, L., Parke, T., Mlodzik, M., Dearolf, C. R. (1999). The *Drosophila* JAK kinase Hopscotch is required for multiple developmental processes in the eye. *Dev. Biol.* **213**, 432-441.
- Luo, H. und Dearolf, C. R. (2001). The JAK/STAT pathway and *Drosophila* development. *BioEssays* **23**, 1138-1147.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987). Deletion analysis of Gal4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**, 847-853.
- Ma, J. und Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 570-594.
- Macaulay, C., Meier, W., Forbes, D. J. (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 254-262.
- Makela, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371**, 254-257.
- Maller, J. L. (1991). Mitotic control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 269-275.
- Manna, S. K., Zhang, H. J., Yan, T., Oberley, L. W., Aggarwal, B. B. (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene* **18**, 4371-4382.

- Martinez, A. M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J. C., Labbe, J. C., Doree, M. (1997). Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* **16**, 343-354.
- Mathias, N., Johnson, S., Byers, B., Boebl, M. (1999). The abundance of cell cycle regulatory protein Cdc4p is controlled by interactions between its F-box and Skp1p. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1759-1767.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouch, M., Ohtsub, M., Misawa, H. (1997). CIS, a cytokine-inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* **89**, 3148-3154.
- Matsumoto, A., Seki, Y., Watanabe, R., Hayashi, K., Johnston, J. A., Harada, Y., Abe, R., Yoshimura, A., Kubo, M. (2003). A role of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3/CIS3/SSI3) in CD28-mediated interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **197**, 425-436.
- Matsuoka, M., Kato, J., Fischer, R. P., Morgan, D. O., Sherr, C. J. (1994). Activation of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7265-7275.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J., Kato, J. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2066-2076.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashum, R. A., Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-713.
- McConnell, B. B., Gregory, F. J., Stott, F., Hara, E., Peters, G. (1999). Induced expression of p16(INK4a) inhibits both cdk4- and cdk2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-cdk-inhibitor complexes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1981-1989.
- McGowan, C. H. und Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* **12**, 75-85.
- McGowan, C. H. und Russell, P. (1995). Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* **14**, 2166-2175.
- McGregor J. R., Xi, R., Harrison, D. A. (2002). JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development* **129**, 705-717.
- Meister, M. und Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell. Microbiol.* **5**, 573-580.
- Meister, M., Hetru, C., Hoffmann, J. A. (2000). The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In: Du Pasquier, L., Litman, G. W. (Eds.), Origin and evolution of the vertebrate immune system. Current Topics in microbiology, Vol. **248**. Springer-Verlag, Berlin, pp. 17-36.

- Monni, R., Santos, S. C., Mauchauffe, M., Berger, R., Ghysdael, J., Gouilleux, F. (2001). The Tel-Jak2 oncoprotein induces Socs1 expression and altered cytokine response in Ba/F3 cells. *Oncogene* **20**, 849-858.
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-291.
- Müller, R. P., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
- Mukhopadhyay, A., Suttles, J., Stout, R. D., Aggarwal, B. B. (2001). Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor-p60 and p80 aggregates ligand-mediated activation of nuclear factor- $\kappa$ B and of mitogen activated protein kinases in macrophages. *J. Biol. Chem.* **276**, 31906-31912.
- Munier, A. I., Doucet, D., Perrodou, E., Zachary, D., Meister, M., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A., Lagueux, M. (2002). PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Rep.* **3**, 1195-1200.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-234.
- Muta, T. und Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 41-47.
- Myrick, K. V. und Dearolf, C. R. (2000). Hyperactivation of the *Drosophila* Hop Jak kinase causes the preferential overexpression of eIF1A transcripts in larval blood cells. *Gene* **244**, 199-125.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929.
- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H., Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF $\kappa$ B and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 14661-14664.
- Nakano, H., Sakon, H., Koseki, H., Takemori, T., Tada, K., Matsumoto, M., Munechika, E., Sakai, T., Shirasawa, T., Akiba, H., Kobata, T., Santee, S., Ware, C., Rennert, P. D., Taniguchi, M., Yagita, H., Okumura, K. (1999). Targeted disruption of TRAF5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9803-9808.
- Nakano, H., Kurosawa, K., Sakon, S., Yagita, H., Yeh, W. C., Mak, T. W., Okumura, K. (2000). Impaired TNF-induced NF-kappaB activation and high sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2- and TRAF5-double deficient mice. *Scand. J. Immuno.* **51**, 71.



- Narazaki, M., Jujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T. (1998). Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 13130-13134.
- Nars, M. und Vihinen, M. (2001). Coevolution of the domains of cytoplasmatic tyrosine kinases. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 312-321.
- Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential development checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397-409.
- Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M. (1999). Mutational analysis of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J.* **18**, 375-385.
- Nigg, E. A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 776-783.
- Nilsson, I. und Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* **4**, 107-114.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998). ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol. Cell* **2**, 389-395.
- Norbury, C., Blow, J., Nurse, P. (1991). Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* **10**, 3321-3329.
- Nosaka, T., Deursen, J. M. A. van, Witthuhn, B. A., McMickle, A. P., Doherty, P. C., Grosveld, G. C. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science* **270**, 800-802.
- Notarangelo, L. D., Mella, P., Jones, A., de Saint Basile, G., Savoldi, G., Cranston, T., Vihinen, M., Schumacher, R. F. (2001). Mutations in severe combined immune deficiency (SCID) due to Jak3 deficiency. *Hum. Mutant.* **18**, 255-263.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating cell cycle timing of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
- Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffmann, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* **2**, 423-427.
- Ohya, K., Kajigaya, S., Yamashita, Y., Miyazoto, A., Hatake, K., Miura, Y., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K., Mano, H. (1997). SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 27178-27182.

- Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J. C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP-4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **128**, 849-862.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the JAK/STAT pathway. *Cell* **109**, S121-S131.
- Page, A. M. und Hieter, P. (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 583-609.
- Pankratz, M. und Jäckle, H. (1993). The development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Papst, P. J., Sugiyama, H., Nagasawa, M., Lucas, J. J., Maller, J. L., Terada, M. (1998). Cdc2-cyclin B phosphorylates p70 S6 kinase on Ser411 at mitosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 15077-15084.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D., Marine, J.-C., Teglund, D. J. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385-395.
- Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Qsawa, M., Arase, H., Hirayama, N. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* **3**, 771-782.
- Parker, L. L. und Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34-cdk2-cyclin B complex by human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955-1957.
- Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* **12**, 692-705.
- Paul, S. und Lombroso, P. J. (2003). Receptor and nonreceptor protein tyrosine phosphatases in the nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2465-2482.
- Pellegrini, S., Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* **248**, 615-633.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A. (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**, 791-801.
- Peters, J. M. (1998). SFC and APC: the yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 759-768.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian Cdc6 by cyclin A/cdk2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **18**, 396-410.

- Perrimon, N. und Mahowald, A. P. (1986). *l(1)hopscotch*, a larval-pupal zygotic lethal with a specific maternal effect on segmentation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **118**, 28-41.
- Pines J. (1994). Arresting developments in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 143-145.
- Pines, J. und Hunter, T. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* **58**, 833-846.
- Pines, J. und Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760-763.
- Pines, J. und Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B are differently located in the cell and undergo cell cycle dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* **115**, 1-17.
- Pines, J. und Hunter, T. (1994). The differential localization of human cyclin A and B is due to a cytoplasmatic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* **13**, 3772-3781.
- Polyak, K., Lee, M., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. (1994). Cloning of p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.
- Poon, R. Y. und Hunter, T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270**, 90-93.
- Preiss, A., Johannes, B., Nagel, A. C., Maier, D., Peters, N., Wajant, H. (2001). Dynamic expression of *Drosophila* TRAF1 during embryogenesis and larval development. *Mech. Dev.* **100**, 109-113.
- Qiu, P., Pan, P. C., Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**, 1909-1920.
- Rank, K. B., Evans, D. B., Sharma, S. K. (2000). The N-terminal domains of cyclin-dependent inhibitory proteins block the phosphorylation of cdk2/cyclin E by the cdk-activating kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 469-473.
- Rehorn, K. P., Thelen, H., Michelson, A. M., Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**, 4023-4031.
- Remillieux-Leschelle, N., Santamaria, P., Randsholt, N. B. (2002). Regulation of larval hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*: a role for the *multi sex combs* gene. *Genetics* **162**, 1259-1274.
- Remy, I., Wilson, I. A., Michnick, S. W. (1999). Erythropoietin receptor activation by ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990-993.

- Richman, J. M. und Lee, S. H. (2003). About face: signals and genes controlling jaw patterning and identity in vertebrates. *Bioessays* **25**, 554-568.
- Rizki, T. M. und Rizki, R. M. (1984). The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In *Insect Ultrastructure*, Vol. 2, King, RC, und Akai, H. (eds). Plenum Publishing Corporation, pp. 579-604.
- Rodig, S., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D. (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and non redundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* **93**, 373-383.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmatic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., Goeddel, D. V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**, 1424-1427.
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A., Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **203**, 266-280.
- Russell, S. M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedly, M. C., Roberts, J. L., Aman, M. J. (1995). Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* **270**, 797-800.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* **112**, 135-142.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-331.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Struct. Biol.* **3**, 696-700.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., Silvennoinen, O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3387-3395.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., Silvennoinen, O. (2002). The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transducers. *J. Biol. Chem.* **277**, 47954-63.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., Silvennoinen, O. (2003). Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1448-59.
- Saijo, K., Park, S. Y., Ishida, Y., Arase, H., Saito, T. (1997). Crucial role of Jak3 in negative selection of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.* **185**, 351-356.

- Sarcevic, B., Lilischkis, R., Sutherland, R. L. (1997). Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell substrates by D1-, D3-, E- and A-type cyclin-CDK complexes. *J. Biol. Chem.* **272**, 33327-33337.
- Schindler, C. und Darnell Jr., J. E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.
- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepp, D. M., Silver, P. A. (1995). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *EMBO J.* **14**, 5367-5378.
- Schmitz, M. L., Bacher, S., Dienz, O. (2003). NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation. *FASEB J.* **17**, 2187-2193.
- Schwiebert, E. M. und Zsembery, A. (2003). extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1615**, 7-32.
- Sebastian, B., Kakizuka, A., Hunter, T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3521-3524.
- Sefton, L., Timmer, J. R., Zhang, Y., Beranger, F., Cline, T. W. (2000). An extracellular activator of the *Drosophila* JAK/STAT pathway is a sex-determination signal element. *Nature* **405**, 970-973.
- Seki, Y., Inoue, H., Nagata, N., Hayashi, K., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Komine, O., Hamano, S., Himeno, K., Inagaki-Ohara, K., Cacalano, N., O'Garra, A., Oshida, T., Saito, H., Johnston, J. A., Yoshimura, A., Kubo, M. (2003). SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat. Med.* **9**, 1047-1054.
- Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187-190.
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G<sub>1</sub> cyclin dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Sherr, C. J. und Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1504-1512.
- Shiels, H., Li, X., Schumacker, P. T., Maltepe, E., Padrid, P. A., Sperling, A., Thompson, C. B., Lindsten, T. (2000). TRAF4 deficiency leads to tracheal malformation with resulting alterations in air flow to the lungs. *Am. J. Pathol.* **157**, 679-688.
- Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S. (2000). Tyk2 plays a restricted role in INF  $\alpha$  signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* **13**, 561-571.
- Shrestha, R. und Gateff, E. (1982). Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* **24**, 65-82.

- Silver, D. L. und Montell, D. J. (2001). Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* **107**, 831-841.
- Skowyra, D. L., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209-219.
- Skowyra, D., Koepp, D. M., Kamura, T., Conrad, M. N., Conaway, R. C., Conaway, J. W. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* **284**, 662-665.
- Solomon, M. J., Glotzer, M., Lett, T., Philippe, M., Kirschner, M. W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63**, 1013-1024.
- Solomon, M. J., Lee, T., Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34<sup>cdc2</sup> activation: identification of an activating kinase. *Mol. Biol. Cell* **3**, 13-27.
- Solomon, M. J. (1994). The function(s) of CAK, the p34<sup>cdc2</sup>-activating kinase. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 496-500.
- Song, H., Hanlon, N., Brown, N. R., Noble, M. E. M., Johnson, L. N., Barford, D. (2001). Phosphoprotein-protein interactions revealed by the crystal structure of kinase-associated phosphatase in complex with phospho-Cdk2. *Mol. Cell* **7**, 615-626.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y., Govind, S. (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev. Biol.* **243**, 65-80.
- Spradling, A. C. (1993). Developmental genetics of oogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate und A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1-70.
- Starr, R. und Hilton, D. J. (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* **21**, 47-52.
- Starr, R., Wilson, T. A., Vilney, E. M., Murray, L. J., Rayder, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicole, N. A., Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* **387**, 917-921.
- Stewart, M. J. und Denell, R. E. (1993). Mutations in a *drosophila* gene encoding ribosomal protein S6 cause tissue overgrowth. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2524-2534.
- Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J. P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells: requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 5989-6000.

- Sugarman, B. J., Aggarwal, B. B., Hass, P. E., Figari, I. S., Palladino, M. A., Shepard, H. M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$ : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**, 943-945.
- Surpin, M., Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 100-109.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., Krasnow, M. (1996). *Branchless* encodes a *Drosophila* FGF homologue that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-1101.
- Takeuchi, M., Rothe, M., Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear-factor kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 19935-19942.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signal through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **245**, 1385-1387.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* **19**, 4298-4309.
- Tassan, J. P., Schulz, S. J., Bartek, J., Nigg, E. A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J. Cell Biol.* **127**, 467-478.
- Tassan, J. P., Jaquenod, M., Fry, A. M., Frutiger, S., Hughes, G., Nigg, E. A. (1995). *In vitro* assembly of functional human cdk7/cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J.* **14**, 5608-5617.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relation to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 1829-1837.
- Thomis, D. C., Gurniak, C. B., Tivol, E., Sharpe, A. H., Berg, L. J. (1995). Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science* **270**, 794- 797.
- Thomis, D. C. und Berg, L. J. (1997). The role of Jak3 in lymphoid development, activation and signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 541-547.
- Toyoshima, H. und Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.
- Tsai, L. H., Harlow, E., Meyerson, M. (1991). Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* **353**, 174-177.
- Tulina, N. und Matunis, N. (2001). Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* **294**, 2546-2549.

- Tworoger, M., Larkin, M. K., Byrant, Z., Ruohola-Baker, H. (1999). Mosaic analysis in the *Drosophila* ovary reveals a common hedgehog-inducible precursor stage for stalk and polar cells. *Genetics* **151**, 739-748.
- Udvary, A. (1996). The role of controlled proteolysis in cell-cycle regulation. *Eur. J. Biochem.* **240**, 307-313.
- Van der Velden, A. W. und Thomas, A. A. M. (1999). The role of 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 87-106.
- Vass, E. und Nappi, A. J. (2001). Fruit fly immunity. *BioEssays* **51**, 529-535.
- Verdier, F., Chretien, S., Muller, O., Valet, P., Yoshimura, A., Gisselbrecht, S. (1998). Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 28185-28190.
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovlenko, A. V., Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Rev. Immunol.* **17**, 331-367.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S., Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpint containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J.* **21**, 5477-5486.
- Wang, Y., Jacobs, C., Hook, K. E., Duan, H., Booher, R. N., Sun, Y. (2000). Binding of 14-3-3 $\beta$  to the carboxyl terminus of Wee1 increases Wee1 stability, kinase activity, and G2-M cell population. *Cell Growth Differ.* **11**, 211-219.
- Watanabe, N., Broome, M., Unter, T. (1995). Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* **14**, 1878-1891.
- Watson, K. L., Johnson, T. K., Denell, R. E. (1991). Lethal (l) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.* **12**, 173-187.
- Watson, K. L., Konrad, K. D., Woods, D. F., Bryant, P. J. (1992). *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11302-11306.
- Wells, N. J., Watanabe, M., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A., Hunter, T. (1999). The C-terminal of the Cdc2 inhibitors kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression. *J. Cell Sci.* **112**, 3361-3371.
- Won, K. A. und Reed, S. I. (1996). Activation of cyclin E-cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* **15**, 4182-4193.



- Won, K. A., Xiong, Y., Beach, D., Gilman, M. (1992). Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9910-9914.
- Xu, Y., Cheng, G., Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity* **5**, 407-415.
- Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A., Kornbluth, S. (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* **12**, 2131-2143.
- Yang, J., Song, H., Walsh, S., Bardes, E. S., Kornbluth, S. (2001). Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 3604-3609.
- Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* **18**, 1309-1320.
- Yeh, C. T., Lu, S. C., Chen, T. C., Peng, C. Y., Liaw, Y. F. (2000). Abberent transcripts of the cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **60**, 4697-4700.
- Yeh, T. C. und Pellegrini S. (1999). The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1523-1534.
- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Dilbert, D. J., Copeland, N. G. (1995). A novel cytokine-induced gene CIS encodes a SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* **14**, 2816-2826.
- Yu, C. L. und Burakoff, S. J. (1997). Involvement of proteasomes in regulating Jak-Stat pathways upon interleukin-2 stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14017-14020.
- Yu, H., Peters, J., King, R. W., Page, A. M., Hieter, P., Kirschner, M. W. (1998). Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* **279**, 1219-1222.
- Zapata, J., Matsuzawa, M. S., Godzik, A., Leo, E., Wassermann, S. A., Reed, J. C. (2000). The *Drosophila* tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 (DTRAF1) interacts with *pelle* and regulates NF- $\kappa$ B activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 12102-12107.
- Zeidler, M. P., Bach, E. A., Perrimon, N. (2000). The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598-2606.
- Zeidler, M. P. und Perrimon, N. (2000). Sex determination: co-opted signals determine gender. *Curr. Biol.* **10**, R682-R684.
- Zeidler, M. P., Perrimon, N., Strutt, D. I. (1999). Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for Unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes Dev.* **13**, 1342-1353.

Zhang, J. G., Farley, A., Nicholoso, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J. (1999). The conserved SOCS-box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongin B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2071-2076.

Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., Harlow, T. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev.* **12**, 456-461.

Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., Barbie, D. A., Matera, A. G., Fletcher, J. A. (2000). NPAT links cyclin E-cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* **14**, 2283-2297.

Zhou, Y. J., Hanson, E. P., Chen, Y. Q., Agnusson, K., Chen, M., Swann, P. G. (1997). Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulates its enzymatic activity. *Proc. Acad. Natl. Sci.* **94**, 13850-13855.

Zhou, Y. J., Chen, M., Cusack, N. A., Kimmel, L. H., Magnuson, K. S., Boyd, J. G., Lin, W., Roberts, J. L., Lengi, A., Buckley, R. H. (2001). Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol. Cell* **8**, 959-969.

Zhou, P. und Howley, P. M. (1998). Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases. *Mol. Cell* **2**, 571-580.